

TRANSFER-RIBONUKLEINSAUREN IN Dictyostelium discoideum

Modifikationen und tRNA-Gene

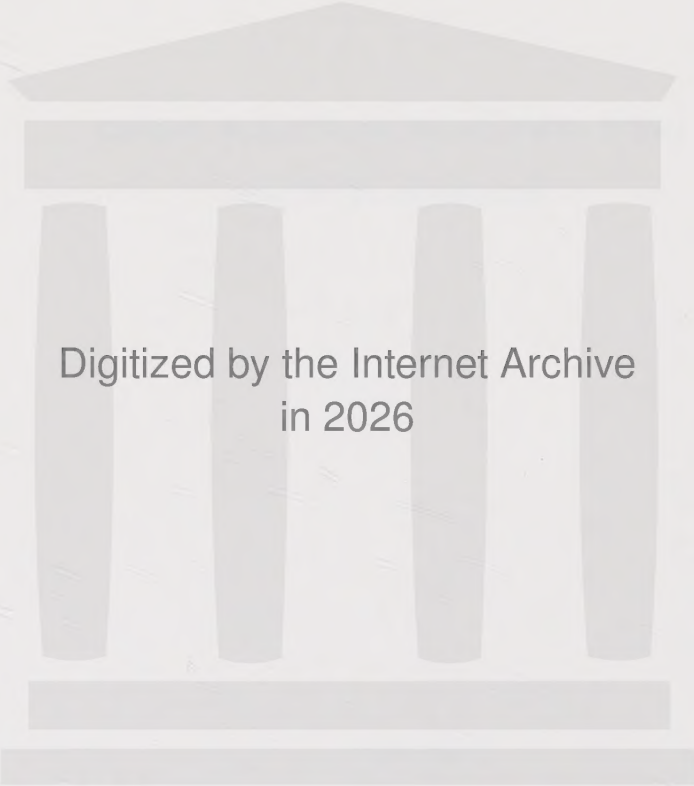
Wolf Bertling

Diss
Erlangen
1984

TRANSFER-RIBONUKLEINSÄUREN IN Dictyostelium discoideum

Modifikationen und tRNA-Gene

Wolf Bertling



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546206_0058

Den Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
zur
Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt
von
Wolf Bertling
aus
Erlangen

Als Dissertation genehmigt von den Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Universität Erlangen-Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung:	20.11.1984
Vorsitzender der Promotionskommission:	Prof. Dr. K. Brodersen
Erstberichterstatte:	Prof. Dr. H. Kersten
Zweitberichterstatte:	Prof. Dr. E. Schweizer

Die vorliegende Arbeit wurde bei Frau Prof. Dr. H.Kersten
-Arbeitsgruppe Biochemie-
Fachbereich Biologie/Chemie
an der Universität Erlangen-Nürnberg durchgeführt

INHALTSVERZEICHNIS

	Abkürzungen	
	Einheiten	
1.	Zusammenfassung	1
2.	Einleitung	4
3.	Der Organismus	9
4.	Material	14
	Biologisches Material	14
	Chemikalien und Geräte	21
	Puffer	24
	Medien	26
5.	Methoden	27
5.1.	Züchtungen	27
5.1.1.	Dictyostelium discoideum	27
5.1.2.	Bakterien	28
5.1.2.1.	"Plating cells"	28
5.2.	Isolierung von Zellbestandteilen	29
5.2.1.	Polysomen von Dictyostelium discoideum	29
5.2.2.	Präparation von tRNA aus Dictyostelium discoideum	29
5.2.3.	Anreicherung von tRNA ^{Asn} -Isoacceptoren	29
5.2.4.	Analytische Trennung von aminoacylierter tRNA	30
5.2.5.	Trennung von tRNA durch 2 D-PAA-Gelelektrophorese	31
5.2.6.	Reindarstellung von tRNA-Isoacceptoren durch Affinitätschromatographie	31
5.2.6.1.	Deacylierung der tRNA	31
5.2.6.2.	Aminoacylierung von tRNA ^{Asn}	31
5.2.6.3.	Aktivierung und Beschickung der EF-Tu-Säule	32
5.2.6.4.	Chromatographie an EF-Tu	32
5.2.6.5.	Konzentrierung der tRNA-Isoacceptoren	32
5.2.7.	Genomische DNA von Dictyostelium discoideum	33
5.2.7.1.	Gesamt-DNA von Dictyostelium discoideum	33
5.2.7.2.	Reine Kern-DNA von Dictyostelium discoideum	33
5.2.8.	Isolierung von AA-tRNA-Synthetasen aus Dictyostelium discoideum	34
5.2.8.1.	Präparation tRNA-freier S-100, S-78 und S-30 -Extrakte	34
5.2.8.2.	Anreicherung der tRNA ^{Asn} spezifischen Synthetasen	34
5.2.9.	Herstellung von Extrakten zur in vitro Verpackung von Phagen-DNA	34

5.2.9.1.	Das "Freeze-Thaw" Lysat	35
5.2.9.2.	Der "Sonicated Extract"	35
5.2.9.3.	Verpackungsreaktion und Infektion	35
5.2.10.	Isolierung von EF-Tu aus E.coli MRE 600	36
5.2.10.1.	Koppelung von EF-Tu an CN-Br aktivierte Sepharose	37
5.2.11.	Präparation von Plasmid-DNA und RF-DNA	37
5.2.11.1.	Präparation großer Mengen	37
5.2.11.2.	Präparation kleiner Mengen	38
5.2.12.	Präparation von Phagen-DNA	38
5.2.12.1.	"Mini-Lysate"	39
5.2.13.	Präparation von "single-strand" DNA aus M 13-Phagen	40
5.2.14.	Isolation von DNA-Fragmenten aus Plasmid und Phagen DNA	40
5.2.14.1.	Trennung auf Agarose-Gelen	40
5.2.14.2.	Trennung auf PAA-Gelen	41
5.2.14.3.	Elektroelution von DNA aus Gelen	41
5.2.14.3.1.	Elektroelution aus Agarose-Gelen	41
5.2.14.3.2.	Elution aus PAA-Gelen	41
5.2.15.	Isolierung von Keimzellkernen aus X.laevis	42
5.2.15.1.	Isolierung der Kerne der Eizellen	42
5.3.1.	Reinigung von Alkalischer Phosphatase	42
5.3.2.	Aminoacylierung von tRNA	43
5.3.3.	Verdauung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	43
5.3.4.	Ligation von DNA-Fragmenten	43
5.3.5.	Ligation von ^{32}pCp an tRNA^{Asn}	44
5.3.6.	Markierung von tRNA mit ^{125}J	44
5.3.7.	Markierung von DNA	45
5.3.7.1.	"Nick repair"	45
5.3.7.2.	Ansatz zur Erzeugung "stumpfer" DNA-Enden (fill-in-Synthese)	46
5.3.7.3.	T_4 -Markierung	46
5.3.8.	Bindungstest von aminoacylierter tRNA an EF-Tu	47
5.3.9.	Periodatshift	47
5.3.10.	In vitro Transkription	47
5.3.11.	In vitro Translation	48
5.3.12.	Transformationsansätze	49
5.3.12.1.	Herstellung kompetenter Zellen	49
5.3.12.2.	Infektion von Bakterien mit Phagen	50
5.3.12.2.1.	Titration einer Lösung mit unbekannter Phagenkonzentration	50

5.4.	Hybridisationstechniken	50
5.4.1.	DNA-Transfer auf Nitrocellulose-Filter	50
5.4.1.1.	DNA Fragmente aus Agarose-Gelen auf NC-Filter	50
5.4.1.2.	Transfer von DNA aus Bakterienkolonien auf Filter	51
5.4.1.3.	Transfer von DNA aus Phagenplaques auf NC-Filter	51
5.4.2.	RNA-Transfer von PAA-Gelen auf "gene screen" Papier	52
5.4.3.	Hybridisationsansätze	52
5.4.3.1.	Fixierte DNA oder RNA, DNA als Probe	52
5.4.3.2.	Fixierte DNA, tRNA als Probe	53
5.5.	Sequenzierung von DNA	53
5.5.1.	Sequenzierung nach der Dideoxymethode	53
5.6.	Konstruktion von Deletionsklonen durch Bal 31 Verdau	55
6.	Ergebnisse	56
6.1.1.	Isolierung von tRNA ^{Asn} aus Dictyostelium discoideum	56
6.1.2.	Trennung der Isoacceptoren der tRNA ^{Asn} aus Dictyostelium discoideum	58
6.1.3.	Kinetische Untersuchungen zur Aminoacylierung von tRNA ^{Asn}	61
6.1.4.	Die Anreicherung von Synthetasen	63
6.1.5.	In vitro Translationssystem	66
6.1.6.	Untersuchungen an EF-Tu von E. coli	69
6.2.1.1.	Bestimmung der Zahl der tRNA ^{Asn} -Gene im haploiden Genom von Dictyostelium discoideum	75
6.2.1.2.	Klonierung eines DNA-Fragments von Dictyostelium discoideum	76
6.2.1.2.1.	Erstellung einer Genbank genomischer DNA von Dictyostelium discoideum im Phagen 590	76
6.2.1.2.2.	Reklonierung	77
6.2.1.3.	Sequenzanalyse	80
6.2.1.4.	Hybridisationsexperimente	84
6.2.1.4.1.	Hybridisation des 800 bp-Fragments gegen tRNA	84
6.2.1.4.2.	Hybridisation von pDDt 2 gegen Dictyostelium discoideum DNA	85
6.2.1.5.	In vitro Transkriptionsexperimente	86
6.2.1.5.1.	Transkription des Plasmids pDDt 2 in einem X.laevis Extrakt	86
6.2.1.5.2.	In vitro Transkription des Plasmids pDDt 2 in einem Hela-Zellextrakt	88

6.3.	Untersuchungen an einem tRNA ^{Val} _{GUA} -Gen	90
6.3.1.	Reklonierung von Fragmenten des Plasmids pDT 206	90
6.3.2.	Sequenzierung eines 180 bp Hinf I-Fragments von Dictyostelium discoideum	90
6.3.3.1.	Bestimmung der Kopienzahl des tRNA ^{Val} _{GUA} -Gens auf dem haploiden Genom von Dictyostelium discoideum	93
6.3.3.2.	Hybridisierung von mp 8/Val 1.4 gegen Gesamt-tRNA von Dictyostelium discoideum	94
6.3.4.	In vitro Transkriptionsexperimente	96
6.3.4.1.	Transkriptionsexperimente in X.laevis Oocytenextrakt	96
6.3.4.2.	In vitro Transkription in Hela-Zellextrakt	97
6.4.	Transkriptionstests der beiden tRNA ^{Val} -Gene	98
6.4.1.	Vergleich der Transkriptionsrate der beiden tRNA ^{Val} -Gene	98
6.4.2.	Untersuchungen zum Einfluß der tRNA-Konzentration auf die Transkriptionsrate	99
6.5.	Vergleich von 5'-flankierenden Sequenzen von tRNAs	101
6.5.1.	ACTGA	102
6.5.2.	TAAAAT	102
6.5.3.	Vergleich zwischen Strukturgen und 5'-flankierenden Sequenzen	104
7.	Diskussion	106
	Literaturverzeichnis	

Erläuterungen der im Text verwendeten Abkürzungen

A	Adenosin	I	Inosin
AA	Aminosäure	J	Jod
1 A ₂₆₀	ist die Menge eines Stoffes in 1 ml Lösung, die bei einer Wellenlänge von 260 nm und einem Lichtweg von einem cm die Absorption 1 zeigt.	kb	Kilobasen: 1000 Basen(paare)
1 A ₆₀₀	analog, jedoch bei 600nm	Lys	Lysin
Asn	Asparagin	Lysozym	Muramidase: Mucopolysaccharid-N-acetylmuramoylhydrolase
Asp	Asparaginsäure	PMSF	Phenylmethansulfonyl-fluorid
ATP	Adenosin-ribosyl-5'-triphosphat	PAA	Polyacrylamid
	analog dazu CTP, GTP und UTP	PAAG	Polyacrylamidgel
OME	O-Mercaptoethanol	2D-PAAG	Zweidimensionales PAAG
bp	base pair: Basenpaar	PDDS	Ammoniumperoxodisulfat
BPB	Bromphenolblau: 3',3'',5',5''-Tetrabromphenolsulfon-phthalein	Ψ	Pseudo-(gen)
BSA	bovine serum albumin: Rinderserumalbumin	PPO	2,5-Diphenyloxazol
C	Cytidin	PVP	Polyvinylpyrrolidon
Cl	Curie	Q	Quercetin: 7-[[[(cis-4,5-Dihydroxy-2-cyclopentenyl)amino]methyl]-7-deazaguanosin
cpm	counts per minute: Impulse pro Minute	REN	DNA-Restriktionsendonuklease
dal	Dalton	RF-DNA	ds DNA aus der Replikativen Form eines ss-Phagen
dATP	Adenosin-desoxyribosyl-5'-triphosphat	RNA	Ribonukleinsäure
	analog dazu dCTP, dGTP und dTTP	RT	Raumtemperatur
DEAE-	Diethylaminoethyl-Cellulose lose	ss DNA	singlestrand DNA: einzelsträngige DNA
Dimethyl-POP	1,4-Bis-2-(4-methyl-5-phenyloxazol)-benzol	S-100	Überstand einer Zentrifugation mit 100 000 g (Erdbeschleunigung)
DMF	Dimethylformamid		analog: S-30 u.ä.
DNA	Desoxyribonukleinsäure	SDS	Natriumdodecylsulfat
dpm	desintegrations per minute: Zerfälle pro Minute	T	Thymidin
ds DNA	doppelsträngige DNA	TMED	Tetramethylethylenediamin
DTT	DL-Dithiothreitol: 2,3-Dihydroxy-1,4-dithiolbutan	Tris	Trishydroxymethyl-amino-methan
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	tRNA	Transfer-RNA
Ethidium-bromid	3,8-Diamino-6-ethyl-5-phenylphenanthridiniumbromid	Tyr	Tyrosin
G	Guanosin	Trp	Tryptophan
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-ethansulfonsäure	XCFF	Xylencyanol FF
His	Histidin	X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid		

Einheiten

m milli u mikro n nano p pico f femto a atto

1 kb DNA $6.5 \cdot 10^5$ dal ds DNA codiert für ca. 37000 dal Protein (333 AA)
 $3.3 \cdot 10^5$ dal ss DNA
 $3.4 \cdot 10^5$ dal ss RNA

Durchschnittsgewicht einer DNA-Base 324,5 dal
" eines DNA-Basenpaares 649 dal

1 ug/ml eines 1 kb langen DNA-Fragments: 3 nM an 5'-Enden

1 A₂₆₀ ds DNA: 50 ug
1 A₂₆₀ ss DNA: 37 ug
1 A₂₆₀ RNA: 44 ug entspr. 1780 pmol tRNA

Berechnungsbeispiel der Molarität eines DNA-Fragments bekannter Länge und bekannter Menge (g):

$$1 \text{ ug (100bp)} = \frac{10^{-6}}{100 \cdot 649} \left[\frac{\text{g}}{\text{bp} \cdot \text{dal}} \right] = 15 \text{ pmol}$$

1. ZUSAMMENFASSUNG

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde in *Dictyostelium discoideum* die Funktion des Deazaguanosinderivates Queuosin, einer Modifikation an Position 34 von Transfer Ribonukleinsäuren spezifisch für Asparagin, Asparaginsäure, Histidin und Tyrosin bei der Proteinbiosynthese studiert. Im zweiten Teil sollte ein tRNA-Gen von *D. discoideum*, insbesondere eines, das für eine tRNA der Q-Familie codiert, cloniert, und die Struktur und Organisation analysiert werden.

Das Deazaguanosin-derivat Q in tRNAs

In Zellen und Geweben ändert sich das Ausmaß der Modifikation Queuosin in den spezifischen tRNAs abhängig von Alter, Differenzierungsgrad und Ernährung.

1. Bei *Dictyostelium discoideum* ändert sich der Gesamt-tRNA-Gehalt der Zelle mit der Zelldichte und dem Alter der Zelle. Der Gesamt tRNA Gehalt liegt bei etwa 20 pmol pro 10^6 Zellen und kann um den Faktor 5 schwanken.
2. Auch das Verhältnis einzelner spezifischer tRNA Isoacceptoren mit und ohne Queuosin ist im logarithmischen und stationären Wachstum unterschiedlich.

Da nach Einsetzen des Entwicklungszyclus, induziert durch Aminosäuremangel, der G-haltige Isoacceptor der tRNA^{Asn} im Vergleich zum Q-haltigen unterbeladen ist (Dingermann 1981), wurde das Verhalten der tRNA^{Asn} Isoacceptoren an den Synthetasen untersucht.

3. Kinetische Untersuchungen über die Beladung Q-haltiger und G-haltiger tRNA^{Asn} zeigen, daß der G-haltige tRNA^{Asn}-Isoacceptor in vitro schneller beladen wird als der Q-haltige. Der $v_{\max}$ -Wert für den G-haltigen tRNA^{Asn}-Isoacceptor liegt doppelt so hoch wie für den Q-haltigen, wohingegen sich beide Isoacceptoren im k_m kaum unterscheiden.

4. Q- und G-haltige Isoacceptoren der tRNA^{Asn} und die Aminoacyl-tRNA-Synthetase für Asparagin wurden angereichert. Das Ziel war, die kinetischen Parameter der Wechselwirkung zwischen modifizierter und untermodifizierter tRNA^{Asn} mit den spezifischen Aminoacyl-tRNA Synthetasen zu untersuchen. Es wurden bei verschiedenen Aufreinigungsverfahren mindestens zwei

AsparaginyI-tRNA Synthetase Aktivitäten gefunden.

5. Zur Isolierung von spezifischer tRNA aus Eukaryonten kann eine Methode verwendet werden, die auf einer Affinitätschromatographie mit dem Elongationsfaktor EF-Tu von *E. coli* beruht. Das Verhalten von Q- und G-haltigem Isoacceptor bei der Bindung an *E. coli* Elongations-Faktor-Tu ist unterschiedlich. Der G-haltige Isoacceptor hat eine höhere Affinität zum Elongationsfaktor als der Q-haltige.

Die Untersuchungen über den Einfluß des Queuosins auf einzelne Schritte der Proteinbiosynthese wurden aufgegeben, als in anderen Arbeiten unseres Arbeitskreises gezeigt werden konnte, daß Queuosin regulatorische Funktion bei der Genexpression hat, und an der Regulation der Expression bestimmter Proteingene auch tRNA-Gene beteiligt sein können (zusammenfassende Literatur Kersten 1984).

Transfer-RNA-Gene bei *Dictyostelium discoideum*

1. Die durch Affinitätschromatographie an einer EF-Tu Säule erhaltene spezifische tRNA^{Asn} wurde verwendet, um durch Hybridisierung gegen genomische *Dictyostelium discoideum* DNA die Kopienzahl der zu tRNA^{Asn} homologen Gene zu bestimmen. Mindestens 5 DNA-Bereiche auf dem haploiden Genom von *D. discoideum* besitzen eine ausreichende Homologie, um mit tRNA^{Asn} zu hybridisieren.

2. Durch Verdau von genomischer *Dictyostelium* DNA und anschließende Ligierung in den Phagenvektor λ 590 wurde eine Genbank von *Dictyostelium discoideum* angelegt. Die gereinigte spezifische tRNA wurde auch dazu verwandt, diese Genbank nach einem tRNA^{Asn} Gen zu durchsuchen. Die DNA eines positiven Clons wurde in einen Plasmidvektor und zur Sequenzierung in den Einzelstrangphagen M 13 recloniert. Die Sequenzierung dieser DNA ergab, daß auf diesem DNA-Abschnitt nur ein tRNA^{Val}_{GUU} Gen aber kein tRNA^{Asn} Gen liegt. Dieses Gen weist allerdings eine strukturelle Besonderheit auf: es überlappt an seinem 5'-Ende mit einer tRNA-ähnlichen Struktur. Der tRNA-ähnliche Teil wird nicht zu einer funktionellen tRNA maturiert und wird deshalb "Pseudogen" genannt. Jedoch auch dieser tRNA-ähnliche Teil kann zu einer kleeblattähnlichen Sekundärstruktur gefaltet werden und enthält fast alle invarianten und semiinvarianten Nukleotide, die für eukaryotische tRNAs typisch sind. Die Bereiche der geninternen Promotoren sind zu mehr als 80 % homolog zu der dafür kürzlich (Sharp 1981a)

definierten Konsensus-Sequenz.

3. Ein weiteres tRNA Gen in einem Plasmid wurde mir von M. Sogin zu Verfügung gestellt. Nach Reclonierung in M 13 und anschließender Sequenzierung wurde dieses Gen als ein tRNA^{Val}_{GUA} Gen identifiziert. Beide tRNA^{Val} Gene erfüllen alle Anforderungen an ein funktionelles tRNA-Gen. Das tRNA^{Val}_{GUU} Gen ist mit dem anderen tRNA^{Val}_{GUA}-Gen zu 77 % homolog und bezüglich der geninternen Promotorsequenzen sogar identisch.

4. In vitro Transkriptionsversuche mit dem tRNA^{Val}_{GUU} Gen legen nahe, daß beide (das tRNA^{Val}_{GUU} und das Pseudogen) als eine Transkriptionseinheit von RNA-Polymerase III transkribiert werden. Das primäre überlange Transkriptionsprodukt wird jedoch wahrscheinlich nur zu einem funktionellen Produkt prozessiert, der tRNA^{Val}_{GUU}. Auch das tRNA^{Val}_{GUA} Gen wird in vitro in einem Xenopus Extrakt transkribiert, jedoch mit deutlich schlechterer Effizienz.

5. In vivo werden tRNAs, die den beiden tRNA^{Val}-Genen homolog sind von Dictyostelium discoideum exprimiert und lassen sich zwei-dimensional elektrophoretisch trennen. Jedoch zeigen Hybridisationsexperimente und Abschätzen der Mengen auf den zwei-dimensionalen Gelen, daß das eine Genprodukt (tRNA^{Val}_{GUU}) deutlich stärker repräsentiert ist.

6. Durch Hybridisationsexperimente dieser Sequenzen gegen genomische DNA von Dictyostelium discoideum läßt sich zeigen, daß beide Gene auf dem haploiden Genom mehrfach repräsentiert sind. In diesem Zusammenhang wird der Einfluß der 5'-flankierenden Sequenz auf die Transkription der nachfolgenden Strukturgene diskutiert.

Der Vergleich dieser 5'-flankierenden Sequenz mit anderen, die in der Literatur beschrieben sind, zeigt eine gewisse Homologie der flankierenden Sequenzen auf. Es handelt sich dabei um einen kurzen Bereich um das Nukleotid -36 herum, die sogenannte "ACTGA-Box", und einen etwas größeren Bereich davor, bestehend aus zwei mindestens 4 bp langen repetitiven Sequenzen. Diese überlappen zum Teil mit der relativ hoch konservierten Sequenz TAA-AAT. Sequenzen aus diesem Bereich zeigen oft eine gewisse Homologie zum nachfolgenden Strukturgen.

2. E I N L E I T U N G

Transfer-Ribonukleinsäuren übersetzen die Codons der mRNA bei der ribosomalen Proteinsynthese. Sie sind beteiligt an der Synthese der Zellwand von Bakterien bei Proteinmodifikationen, bei der nicht-ribosomalen Synthese einiger Oligopeptide und ähnlichem (Übersicht: Clark 1978). Darüber sind sie an der Regulation der Genexpression beteiligt (Übersicht: LaRossa, R., Söll, D. 1978, Buck, Griffith 1982, Kersten 1984). Alle tRNA Gene enthalten Erkennungsstellen für die Transkription. Die primären Transkriptionsprodukte werden von prozessierenden und modifizierenden Enzymen erkannt und zum Teil von Proteinen, die den Transport durch die Kernmembran ermöglichen. Die maturierte tRNA hat spezifische strukturelle Eigenschaften für die Erkennung ihrer Aminoacyl-tRNA-Synthetasen, für die Faktoren der ribosomalen Proteinbiosynthese und funktionelle Domänen des Ribosoms (z.B. Peptidyltransferase). Transfer-RNAs bestehen aus 70 bis 95 Nukleotiden, die für alle tRNAs eine kleeblattähnliche Sekundärstruktur und - wie aus kristallographischen Untersuchungen hervorgeht - eine L-förmige Tertiärstruktur bedingen.

Eine Besonderheit, die tRNAs von anderen RNAs unterscheidet, liegt neben ihrer geringen Größe und starken strukturellen Restriktion in der großen Anzahl modifizierter Nukleoside. Verallgemeinernd läßt sich sagen, daß der Anteil modifizierter Nukleoside mit der Stellung eines Organismus im evolutionären Gefüge ansteigt: während bei *E. coli* ca. 5 % aller Nukleoside modifiziert sind, liegen bei Eukaryonten bis zu 20 % der Nukleotide modifiziert vor (zusammenfassende Literatur Gauss, Sprinzl 1983). Eine Übersicht über einige bekannte Modifikationen findet man bei Nishimura (1978). Eine zusammenfassende Hypothese zur Funktion von Modifikationen wurde von Kersten et al. (1983) vorgestellt. Einflüsse des Modifikationsgrades auf der Ebene der Transkription und Translation wurden schon mehrmals beobachtet (Buck, Griffith 1982, Dingermann et al. 1981).

Das in dieser Arbeit untersuchte Queuosinderivat (7{[(cis-4,5-Dihydroxy-2-cyclo-penten-yl)amino]methyl}-7-deazaguanosin) ist das bisher einzige bekannte Beispiel eines 7-Deazapurins. Queuosin (Q) ist evolutionär sehr alt. Es kommt bis auf wenige Ausnahmen (Hefe: Sprinzl, Gauss 1982) in allen pro- und eukaryotischen tRNAs vor, die für Asp, Asn, His und Tyr

spezifisch sind, der sogenannten "Q-Familie" der tRNAs. Dort ersetzt es, sofern einzelne Spezies nicht untermodifiziert sind, das G in der ersten Position des Anticodons (Nukleotid 34). Änderungen des Q (34)-/G (34)-Verhältnisses in den tRNA-Isoacceptoren der "Q-Familie" wurden in Tumorgewebe und während der Zelldifferenzierung gefunden (Okada et al. 1978, Singhal et al. 1981, Übersicht: Nishimura 1983).

Als mit dieser Arbeit begonnen wurde, war über die Funktion des modifizierten Nukleosids Q nichts bekannt. Alle Arbeitshypothesen verschiedener Arbeitskreise gingen davon aus, daß Queuosin die Aminoacylierung der spezifischen tRNAs oder die Codon-Anticodon Erkennung am Ribosom und möglicherweise den Codongebrauch einer bestimmten Klasse von mRNAs beeinflussen würde.

Daher sollte im ersten Teil der Arbeit der Einfluß des modifizierten Nukleosids Q auf verschiedene Teilschritte der Proteinbiosynthese untersucht werden, z.B. die Auswirkung einer Untermodifizierung auf die Aminoacylierbarkeit der tRNA und die Stabilität des ternären Komplexes EF-Tu-GTP-aatRNA^{aa}. Unterbeladene tRNAs können nach einem Modell von Bergmann und Lodish (1979) einen Zerfall von Polysomen bedingen und somit eine Signalfunktion bei Entwicklungsprozessen übernehmen. Von Dingermann et al. (1981) wurde festgestellt, daß zu Beginn der Entwicklung von *D. discoideum* nur noch einer der beiden tRNA^{Asn} Isoacceptoren, der Q-haltige, beladen ist.

Als Modellsystem wurde *Dictyostelium discoideum* gewählt (s.u.). Dieser Organismus lebt als Einzeller solange er mit genügend Nährstoffen versorgt ist, durchläuft jedoch unter Mangelbedingungen einen Differenzierungszyklus. Von diesem Organismus waren die Isoacceptorenmuster sämtlicher tRNAs aus vegetativen Amöben und aus Zellen in der Differenzierungsphase beschrieben (Palatnik et al. 1977). Änderungen im Isoacceptorenmuster der tRNAs der Q-Familie wurden dabei beobachtet.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit Untersuchungen zur Organisation und Funktion von tRNA-Genen. Dazu sollten tRNA-Gene der Q-Familie isoliert werden, ihre Struktur und Organisation aufgeklärt und ihr Transkriptionsverhalten untersucht werden.

In letzter Zeit sind auf dem Gebiet der Technologie der DNA-Rekombination (Übersicht: Sinsheimer 1977) und der Analyse von DNA-Sequenzen (Übersicht: Deininger 1983) große Fortschritte erzielt worden. Diese Entwicklungen haben unter anderem auch das Studium der tRNA-Gene und ihre Expression wesentlich vorangebracht.

Änderungen individueller tRNA-Isoacceptoren während des Wachstums und der

Entwicklung von *Dictyostelium discoideum* sind nach Palatnik et al. (1977) auf Unterschiede im Ausmaß der Basenmodifikation der gebildeten tRNAs zurückzuführen. Schon früher waren ähnliche Beobachtungen für *Drosophila* gemacht worden (White et al. 1973). Es liegen auch Ergebnisse vor, die zeigen, daß in transformierten Zellen Änderungen im tRNA-Isoacceptoren-Muster auf Modifikationsunterschiede zurückzuführen sind (Okada et al. 1978, Raba et al. 1979). Bisher gibt es nur ein Beispiel für eine eindeutige entwicklungsbedingte Regulation der tRNA-Gen-Expression über ihre Syntheserate: Eine tRNA^{Ala}-Spezies, die spezifisch für die Seidendrüsen von *Bombyx mori* ist (Fournier et al. 1976, Sprague et al. 1977, Chavancy et al. 1981). Ein sehr diffiziler Mechanismus zur Regulation der Expression von tRNA-Genen muß in der Zelle vorhanden sein, um einen koordinierten Spiegel der einzelnen tRNA-Spezies und ihrer oft sehr nahe verwandten Gen-Familien zu gewährleisten. Individuelle Anreicherungen oder Unterrepräsentationen innerhalb bestimmter Zellen können durch unterschiedliche Expressionsaktivitäten, wie Amplifikation oder spezielle transkriptionsfördernde Faktoren im Zusammenhang mit z.B. 5'-flankierenden Sequenzen (vgl. Chavancy et al. 1981, Larson et al. 1983, Dingermann et al. 1982) und durch unterschiedliche Stabilität der Genprodukte bzw. deren Transport oder Prozessierung (Litt, Howell-Litt 1980, Zasloff 1983, Ott 1984) bedingt sein.

Je nach Organismus enthält eine Zelle ca. 40 bis 80 tRNA-Spezies. Von den Prokaryonten sind die tRNA-Gene von *E. coli* am besten untersucht. Etwa 60 tRNA-Gene liegen in zahlreichen Clustern vor, die über das gesamte Genom verteilt sind (Übersicht: Abelson 1979). Einige tRNA-Gene sind auch in rRNA-Operons und in Transkriptionseinheiten für mRNA enthalten (Lund et al. 1976, Miajima et al. 1981). Auch die 8 tRNA-Gene des Phagen T4 liegen geclustert vor.

Organellen enthalten gewöhnlich eine stark reduzierte Anzahl an tRNA-Genen, so z.B. das menschliche mitochondriale Genom (16.569 bp) (Anderson et al. 1981). Hier sind die tRNA-Gene über das gesamte Genom verteilt, die meisten davon anschließend an das 3'-Ende eines proteincodierenden Gens (Oyala et al. 1981). Eventuell sind sie an der Prozessierung der einzelnen mRNAs beteiligt. Auch bei Hefe-Mitochondrien liegen die tRNA-Gene in der Regel einzeln und verteilt auf dem Genom vor, bei *Neurospora* jedoch in zwei großen Clustern zusammen mit rRNA-Genen. Transfer-RNA-Gene von Organellen und besonders von Mitochondrien unterscheiden sich jedoch nicht nur auf Grund ihrer etwas unterschiedlichen Codon-Erkennung, sondern auch durch ihre oft ungewöhnlichen strukturellen Gegebenheiten (Heckman, RajBhandary 1980).

Bei Eukaryonten liegt die Zahl der tRNA-Gene zwischen 300 (Hefe: Schweizer et al. 1969) und 1300 (Hela: Hatlan, Attardi 1971). Für *Dictyostelium discoideum* wurden 800 bis 1200 tRNA-Gene (Peffley, Sogin 1981) ermittelt. Die tRNA-Gene für Hefe (Olson et al. 1977) und Hela-Zellen (Aloni et al. 1977) liegen wahrscheinlich über das ganze Genom verteilt vor. Für *Xenopus laevis* wurden einige Cluster gefunden (Clarkson et al. 1978).

Prokaryotische tRNA-Gene können als polycistronische oder monocistronische Einheiten transkribiert und später zu den fertigen einzelnen tRNAs prozessiert werden (Rossi et al. 1980). Das Vorkommen von Suppressor-tRNAs in Mutanten erleichterte die Definition des tRNA-Genpromotors von *E. coli* (Sekiya, Khorana 1974). Prokaryotische tRNA-Gene enthalten im wesentlichen dieselben Erkennungsstrukturen für RNA-Polymerase wie Proteingene. Diese Sequenzen liegen innerhalb der "Pribnow-Box" (Pribnow 1975) und der -35-Region (Berman, Landy 1979). Bisher wurden keine spezifischen Transkriptionsfaktoren für tRNA-Gene bei *E. coli* identifiziert.

Mit wenigen Ausnahmen (Dimere bei Hefe: Mao et al. 1980, Schmidt et al. 1980) werden eukaryotische tRNA-Gene als monomere Einheiten transkribiert. Im Gegensatz zu Prokaryonten sind bei Eukaryonten die CCA-Enden nicht mitcodiert. Die 3'-flankierenden Sequenzen der tRNA-Gene sind AT-reich und stellen Terminationssignale (Folgen von vier oder mehr T auf dem nichtcodierenden Strang) dar (Tekamp et al. 1979, Hagenbüchle et al. 1979). Bislang konnten in den 5'-flankierenden Sequenzen keine stark konservierten Bereiche identifiziert werden, die als Regulationssignale zur tRNA-Genexpression dienen könnten, obwohl eigene Untersuchungen Gemeinsamkeiten in dieser Region zwischen verschiedenen tRNA-Genen aufzeigen. Eine Besonderheit eukaryotischer tRNA-Gene sind ihre geninternen Promotoren (Sharp et al. 1981a, Hofstetter et al. 1981, Galli et al. 1981, Ciliberto et al. 1982). Solche Promotorbereiche finden sich auch in 5S-RNA-Genen und einigen virusassoziierten Genen (Jat, Arrand 1982, Rosa et al. 1981, Bogenhagen et al. 1980), die auch von RNA-Polymerase III transkribiert werden. In allen Fällen, auch bei *Dictyostelium discoideum* besteht dieser Promotor aus zwei Blöcken. Der eine umfaßt Sequenzen, die für den D-Stamm und D-Loop einer tRNA codieren, der andere liegt im Bereich des T-Stamms und T-Loops einer tRNA. Selbst prokaryotische tRNA-Gene können, falls sie die Anforderungen an einen geninternen Promotor erfüllen, von eukaryotischer RNA-Polymerase III transkribiert werden (Gruissem et al. 1982, Folk 1982). Zur Regulation der Transkription erscheinen diese Promotorblöcke

jedoch nicht ausreichend - sie sind ja schließlich für alle Gene einer tRNA-Isoacceptorfamilie identisch. In diesem Zusammenhang zeigen einzelne Ergebnisse von Transkriptionsstudien an Insekten, daß die 5'-flankierenden Sequenzen von Bedeutung sind. Ein tRNA^{Ala}-Gen von *Bombyx mori* wird im homologen Extrakt nur transkribiert, wenn die nativen 5'-flankierenden Sequenzen vorhanden sind. Von vier tRNA^{Arg}-Genen von *Drosophila melanogaster* ist eines jedoch inaktiv, wenn es seine 5'-flankierende "Kontrollsequenz" enthält (DeFranco et al. 1981, Dingermann et al. 1982, Sprague et al. 1980, Larson et al. 1983).

Untersuchungen zur Prozessierung des Primärtranskripts wurden bisher bei *Dictyostelium discoideum* noch nicht angestellt, jedoch sollte das Prinzip anderer Eukaryonten beibehalten sein. Nach der Transkription wird das Primärtranskript sowohl 3' als auch 5' auf die Länge der maturen DNA zugeschnitten. Die eventuell intervenierenden Sequenzen werden durch "splicing" entfernt (Ogden et al 1981). Sofern nicht mitcodiert wird das 3' CCA-Ende angefügt - keines des bisher sequenzierten tRNA-Gene von *Dictyostelium discoideum* codiert für sein CCA-Ende - und Modifikationen werden eingefügt.

Nach dem Transport durch die Kernmembran - auch dieser Transport ist durch bestimmte Basen zu beeinflussen (Zasloff 1983) - nimmt die tRNA im Cytoplasma ihre vielfältigen Funktionen wahr. Neben der bekanntesten, der Bereitstellung der der mRNA-Sequenz entsprechenden Aminosäure am Ribosom und deren Transport dorthin, sind tRNAs auch an vielen anderen Prozessen beteiligt (Übersicht: LaRossa, Söll 1978) unter anderem bei Proteinmodifikationen und der Kontrolle der Genexpression (Schachner 1984, Jänel 1984).

Modifizierte Nukleoside in tRNAs, wie sie auch bei *Dictyostelium discoideum* häufig vorkommen, haben sowohl auf die Proteinbiosynthese als auch auf andere regulatorische Prozesse Einfluß (Kersten et al. 1983). Eine besondere Bedeutung scheint dabei das bei einigen tRNAs (tRNA^{Asn}, tRNA^{Asp}, tRNA^{His}, tRNA^{Iyr}, der sog. "Q-Familie" der tRNAs) in der ersten Position des Anticodons vorkommende Queuosin zu haben. Bei *Dictyostelium discoideum* ist der Gehalt an tRNAs an diesem Nukleosid Schwankungen unterworfen, die sowohl vom Ernährungszustand, vom Grad der Differenzierung und vom Alter der Zellen abhängen.

Von *Dictyostelium discoideum* ist bisher erst ein tRNA-Gen charakterisiert - ein tRNA^{Irp}-Gen (Peffley, Sogin 1981). In dieser Arbeit werden ein tRNA^{Val}_{GUU}-Gen, ein Pseudogen und ein tRNA^{Val}_{GUA}-Gen identifiziert und charakterisiert.

3. Der Organismus

Die Myxomyceten, "Schleimpilze", sind phylogenetisch sehr tiefstehende Organismen. Zwei Ordnungen, deren Verwandtschaft zweifelhaft ist, werden dazugerechnet. Die Myxomycetales, vielkernige Plasmodien, scheinen Beziehungen zu farblosen Flagellaten zu haben, die Acrasiales hingegen sind in vielerlei Hinsicht, z.B. 5S-rRNA-Verwandtschaft, eher mit Amöben in Verbindung zu bringen. Auch einige ciliate Protozoa bilden ähnliche Fruchtkörper (Olive 1978, Olive, Bluntin 1980). Beide Ordnungen werden von vielen Autoren gar nicht zu den Mycophyta gerechnet. Die gesamte Sequenz von *Dictyostelium discoideum* 5S-rRNA ist bestimmt worden (Hori et al. 1980) und stellt *Dictyostelium discoideum* den Amöben näher als den Pilzen. *Dictyostelium discoideum*, ein Vertreter der Acrasiales, wurde 1935 von Raper in den Wäldern North Carolinas entdeckt, kommt aber fast überall in ähnlichen Biotopen vor. In der Natur ernährt er sich hauptsächlich von Bakterien (Wildtypstamm NC 4) (Sussman 1976). Für das Labor wurden zahlreiche Mutanten gezüchtet, die auch in flüssigen Nährstoffkulturen -axenisch- wachsen können (Watts, Ashworth 1970).

Für die vorliegende Arbeit wurde eine dieser Mutanten (AX-2-216 Gerisch) verwendet. Unter den hier verwendeten Kulturbedingungen ist *Dictyostelium discoideum* hauptsächlich haploid und wächst asynchron (Sussman, Sussman 1962, Zada-Hames 1977, Zada-Hames, Ashworth 1978). Selten, nur wenn Zellen offensichtlich anderen Geschlechtstyps (mating type) zusammentreffen, durchläuft *Dictyostelium discoideum* einen sexuellen Zyklus. Zwei Zellen fusionieren und bilden eine Makrozyste mit diploidem Chromosomensatz. Nach Meiosis entstehen wieder haploide Amöben.

Für Untersuchungen von Differenzierungsphänomenen wird jedoch der parasexuelle Lebenszyklus von *Dictyostelium discoideum* genutzt. Bei Nahrungsmangel treten vegetativ wachsende Amöben in das erste Entwicklungsstadium, die Präaggregation. Nach 4 bis 6 Stunden beginnen die Zellen aufeinander zuzuwandern. Als chemotaktisches Signal scheiden sie dann cAMP aus. An die Aggregation schließt sich ein Pseudoplasmodialstadium an, die Zellwände werden also nicht aufgelöst. Nach etwa 18 Stunden setzt die Kulminationsphase ein. Damit beginnt die Differenzierung in Stiel- und Fußzellen und später Sporen. Reife Fruchtkörper mit Sporen werden nach etwa 24 bis 30 Stunden beobachtet. Aus dem ursprünglichen Aggregat von ca. 100 000 Amöben entstehen etwa 50000 Sporen (Abb. 1).

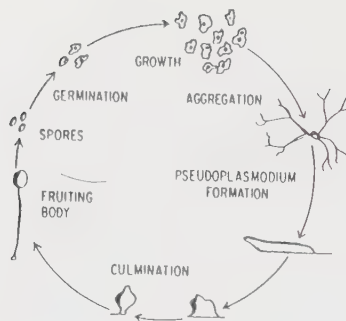


Abb. 1

Lebenszyklus von *Dictyostelium discoideum*. Bis zu 10^5 Amöben aggregieren und bilden Pseudoplasmodien. Die Fruchtkörper sind 1-2 mm hoch und enthalten etwa $7 \cdot 10^4$ ellipsoide Sporen (Quelle: Loomis 1975).

Wegen der leichten Handhabung in Flüssigkultur, der gut steuerbaren Differenzierung, die etwa 95 % der Zellen synchron durchlaufen (Loomis 1975), und der relativ gut bekannten Genetik (Übersichtsarbeit: Loomis 1982) eignet sich *Dictyostelium discoideum* hervorragend als Modellsystem, um die Biochemie eukaryotischer Differenzierungsvorgänge zu beobachten.

Genom

Ein weiterer Vorteil ist, daß *Dictyostelium discoideum* im Gegensatz zu anderen Zellsystemen, die in Zellkultur zu halten sind, ein relativ kleines Genom hat. Etwa 28% des gesamten DNA-Gehalts einer Zelle liegt in den Mitochondrien vor. Die Größe des normalerweise haploiden Genoms umfaßt ca. 5×10^7 bp, was etwa 3.3×10^{10} dal entspricht. Damit ist das Genom von *Dictyostelium discoideum* ungefähr 10 bis 12 mal größer als das von *E. coli*, hat damit jedoch nur 1 bis 2% der Größe eines Säuger-genoms. Die Kern-DNA ist auf 7 Chromosomen verteilt, die anhand genetischer Marker charakterisiert sind (Newell 1982). (Tabelle 1)

Tabelle 1
Genetische Loci von *D. discoideum* in den "Linkage groups"
I bis VII (aus: Loomis 1982).

Linkage group	Gene symbol	Mutant phenotype	Linkage group	Gene symbol	Mutant phenotype	Linkage group	Gene symbol	Mutant phenotype
I	<i>acrB</i>	Growth in the presence of acriflavin (100 µg/ml)	III	<i>radH</i>	Sensitive to UV and γ-irradiation	VI	<i>aglL</i>	Aggregation deficient
	<i>aggB</i>	Aggregation deficient		<i>slgE</i>	Unable to develop beyond slug stage		<i>bunA</i>	Formation of brown pigment
	<i>hcnA</i>	Growth in the presence of heinate (600 µg/ml)		<i>sikA</i>	Differentiation only into stalk cells		<i>bagC</i>	Unable to grow on <i>Bacillus subtilis</i>
	<i>cadA</i>	Growth in the presence of cadmium sulfate (150 µg/ml)		<i>stnB</i>	Formation of large aggregation streams		<i>ebfA</i>	Growth in the presence of ethidium bromide (35 µg/ml)
	<i>couB</i>	Sensitivity to coumarin (1.3 mM)		<i>stnD</i>	Formation of large aggregation streams		<i>ebfB</i>	Growth in the presence of ethidium bromide (35 µg/ml)
	<i>cycA</i>	Growth in the presence of cycloheximide (500 µg/ml)		<i>sprB</i>	Long spores			Spore mass tends to slide to base of fruiting body
	<i>devA</i>	Developmental mutation		<i>tsgD</i>	Temperature sensitive for growth		<i>minA</i>	Colonies grow very slowly on SM agar
	<i>malA</i>	Mating-type locus (also <i>matA</i>)		<i>tsgF</i>	Temperature sensitive for growth		<i>nagA</i>	Altered <i>N</i> -acetylglucosaminidase activity
	<i>modA</i>	Alteration of glycosidase protein modification		<i>tsgI</i>	Temperature sensitive for growth		<i>pdaA</i>	Deficient in phosphodiesterase
	<i>radA</i>	Sensitive to UV and γ-irradiation		<i>whiA</i>	White spore mass		<i>radD</i>	Sensitive to UV and γ-irradiation
	<i>sprA</i>	Round spores		<i>acrC</i>	Growth in the presence of acriflavin (100 µg/ml)		<i>radF</i>	Sensitive to UV and γ-irradiation
	<i>tsgE</i>	Temperature sensitive for growth		<i>alpA</i>	Altered alkaline phosphatase activity		<i>rdeA</i>	Rapid development
	<i>tsgI</i>	Temperature sensitive for growth		<i>azeB</i>	Axenic growth (provided <i>azeA</i> is present)		<i>slgC</i>	Long delay at slug stage
	<i>tsgL</i>	Temperature sensitive for growth		<i>bagA</i>	Unable to grow on <i>Bacillus subtilis</i>		<i>slgI</i>	Unable to develop beyond slug stage
	<i>tagQ</i>	Temperature sensitive for growth		<i>codD</i>	Sensitivity to coumarin (1.3 mM)		<i>sprH</i>	Round spores
	<i>acrA</i>	Growth with acriflavin (100 µg/ml) or methanol (2%)		<i>radB</i>	Sensitivity to UV and γ-irradiation		<i>tagB</i>	Spores fail to mature
	<i>aggA</i>	Aggregation deficient		<i>radC</i>	Sensitive to UV irradiation		<i>whiC</i>	Temperature sensitive for growth
	<i>aggF</i>	Aggregation deficient		<i>radE</i>	Sensitive to UV and γ-irradiation			White spore mass
	<i>arsA</i>	Aggregation deficient		<i>slgB</i>	Sensitive to UV and γ-irradiation			
II	<i>arsB</i>	Growth in the presence of Na arsenate (1.5 mg/ml)	IV	<i>slgD</i>	Unable to develop beyond the slug stage	VII	<i>gluA</i>	Altered β-glucosidase activity
	<i>arsC</i>	Growth in the presence of Na arsenate (1.5 mg/ml)		<i>slgC</i>	Unable to develop beyond the slug stage		<i>manA</i>	α-mannosidase-1 deficient
	<i>azeA</i>	Axenic growth (provided that <i>azeB</i> is present)		<i>stnC</i>	Formation of large aggregation streams		<i>sluA</i>	Deficient in stalk formation
	<i>azeC</i>	Axenic growth (provided <i>azeA</i> and <i>azeB</i> are present)		<i>stnE</i>	Formation of large aggregation streams		<i>bsgB</i>	Unable to grow on <i>Bacillus subtilis</i>
	<i>chpA</i>	Altered discoidin (CBP) protein		<i>tsgA</i>	Temperature sensitive for growth		<i>colA</i>	Growth with coloidal chloride (300–360 µg/ml)
	<i>cljA</i>	Wide band of unaggregated amoebae in colony		<i>tsgC</i>	Temperature sensitive for growth			Sensitivity to coumarin (1 mM)
	<i>couC</i>	Sensitivity to coumarin (1.3 mM)		<i>tsgJ</i>	Temperature sensitive for growth		<i>slgJ</i>	Formation of aggregates in rings in clones on agar
	<i>couE</i>	Sensitivity to coumarin (1.3 mM)		<i>tsgN</i>	Temperature sensitive for growth		<i>stnA</i>	Unable to develop beyond slug stage
	<i>couF</i>	Sensitivity to coumarin (1.3 mM)		<i>tsgR</i>	Temperature sensitive for growth		<i>tagA</i>	Formation of large aggregation streams
	<i>devB</i>	Developmental mutation		<i>whiB</i>	White spore mass		<i>tagC</i>	Temperature sensitive for growth
	<i>nozA</i>	Sensitivity of development to ω-amino acids		<i>acrD</i>	Growth in the presence of acriflavin (100 µg/ml)		<i>tagK</i>	Temperature sensitive for growth
				<i>aggJ</i>	Aggregation deficient		<i>tagM</i>	Temperature sensitive for growth

Etwa 75% der DNA-Sequenzen kommen nur einmal auf dem Genom vor (single copy), die restlichen 25 - 30 % der Sequenzen kommen jeweils zwischen 5- und 500-fach auf jedem Genom vor. Den Hauptteil davon stellen die Gene für die ribosomale RNA (rDNA). Dadurch, daß die rDNA so hoch repetitiv ist, kann man sie bei einem Verdau von genomischer DNA mit Restriktionsendonuklease (REN) als Banden erkennen (Vergl. Abb. 29) und sie somit als internen Größenmarker verwenden. Auch die Gene für tRNAs liegen mehrfach vor (Peffley, Sogin 1981, Dingermann et al. 1984a).

Eine Besonderheit von genomischer *Dictyostelium discoideum* DNA scheint ihr außergewöhnlicher AT-Reichtum (78 %, vergl. Dingermann et al. 1984a) zu sein. Untersucht man nur die Gebiete, die für transkribierbare Gene codieren, so liegt dort der GT-Gehalt etwa bei 35 % (Firtel, Bonner 1972, Kimmel, Firtel 1980), was für die restliche Region - 5' und 3' der Gene, "intervening sequences" und rDNA spacer Sequenzen - einen noch höheren Gehalt an AT bedingt: 85 % bis 95 %.

Mit isoschizomeren REN, die die jeweilige Sequenz erkennen oder nicht, je nachdem, ob eine Base methyliert ist, wurde der Methylierungsgrad der genomischen *Dictyostelium discoideum*-DNA untersucht (Kimmel, Firtel 1979, Kindle, Firtel 1978). Es konnte keine substantielle Methylierung von DNA-Sequenzen in vegetativen *Dictyostelium discoideum*-Zellen festgestellt werden. Ob DNA-Methylierung überhaupt vorkommt und eventuell an der Genexpression beteiligt ist, ist fraglich, ebenso ob ein Zusammenhang zwischen Methylierungsdefizienz und dem hohen AT-Gehalt vorliegt.

Der DNA-Gehalt von *Dictyostelium discoideum* ist nicht konstant. Axenisch wachsende Zellen sind multinukleär und haben einen höheren DNA-Gehalt als Amöben auf bakteriellem Substrat, die mononukleär sind. Am Anfang des Entwicklungszyklus sind alle Zellen mononukleär. Bei stationären Zellen jedoch ist der DNA-Gehalt pro Zellkern stark erhöht, da sie in der G₂-Phase aufgelaufen sind (Sharpe et al. 1984).

Transfer-RNA-Gene und ihre Transkriptionskontrolle

Auf dem haploiden Genom von *Dictyostelium discoideum* liegen 800 - 1200 tRNA-Gene (Peffley, Sogin 1981). Damit liegt *Dictyostelium discoideum* zwischen Hefe mit etwa 300 tRNA-Genen (Schweizer et al. 1969), *Drosophila m.* mit 600 bis 800 (Ritossa 1966, Tartoff, Perry 1970) und Hela-Zellen mit rund 1300 Kopien (Hatlan, Attardi 1971).

Hybridisationsanalysen zeigten, daß es für tRNA^{Trp} in Dictyostelium mindestens 6 Gene gibt (Peffley, Sogin 1981). Auch die Anzahl der Gene für tRNA^{Asn} und tRNA^{Val} liegen in der gleichen Größenordnung (Dingermann et al. 1984).

Wie bei anderen Eukaryonten kennt man auch bei Dictyostelium discoideum tRNA-Gene mit und ohne Introns - das tRNA^{Trp}-Gen besitzt eine 13 bp lange "intervening sequence" im Anticodonloop-Bereich. Welche Bedeutung eine solche Struktur auf die Transkription, die Stabilität des Transkriptionsprodukts, die Prozessierung oder Modifizierung hat, ist bislang unklar.

4. MATERIAL

Biologisches Material

Amphibien: *Xenopus laevis* Afrikanischer Krallenfrosch

Bakterienstämme:

Alle verwendeten *E. coli* Stämme wurden entsprechend den Literaturangaben auf ihre Identität geprüft.

Genotyp	Verwendung/Literatur
BHB 3000: N 205, rec A ⁻	Aufzucht von λ 590 Enthält Maltose induzierbare Antigene, die der Anheftung und Erkennung von Phagen dienen.
BHB 2688: N 205, rec A ⁻ [(λ imm ⁴³⁴ , c, ts 62, red 3, b ₂ , E am 4, S am 7)/ λ]	Herstellung von "in vitro packaging extract". Enthält λ -Lysogen, defekt an Phagenkopf.
BHB 2690: N 205, rec A ⁻ [(λ imm ⁴³⁴ , c, ts 62, red 3, b ₂ , D am 15, S am 7)/ λ]	Herstellung von Phagenköpfen für "in vitro packaging". Defekt an Verpackungsenzym. (Hohn 1979, Hohn, Murray 1977)
JM 103: Δ (lac, pro), thi, str ^r A, sup E, end A, sbc B, hsd R, F' tra D 36, pro AB, lac I ⁻ , Z Δ M 15	F-Stamm, als Wirt für "malespecific singlestrand" Phagen M 13. (Messing et al. 1981)
HB 101: F, hsd S ₂₀ (r _g ^m), rec A ⁻ , ara 14, pro A 2, lac Y 1, gal k 2, rps L 20, xyl ¹⁸ 5, mtl 1, sup E 44, λ ⁻	Stamm mit defekter DNA-Reparaturfähigkeit, zur Aufzucht und Vermehrung von Plasmiden. (Boyer, Rouland-Dussoix 1969)
Q 359: hsd R _k ⁻ , hsd M _k ⁻ , sup F, ϕ 80, P2, su ⁺	Zur Aufzucht der Dictyostellium library (λ 47.1) Ein su ⁺ -Wirt, dient der Erkennung von spi-recombinanten λ -Phagen. Besitzt Maltose-induzierbare Antigene, die der Erkennung und Anheftung von Phagen dienen. (Karn et al. 1980)

Vektoren

Phagen

λ-590 Einzelne Schnittstelle für Hind III
 Länge 39 000 bp
 Linker Arm 28 960 bp
 Rechter Arm 10 080 bp
 Dieser Vektor ist bei Williams und Blattner (1980) genauer beschrieben.

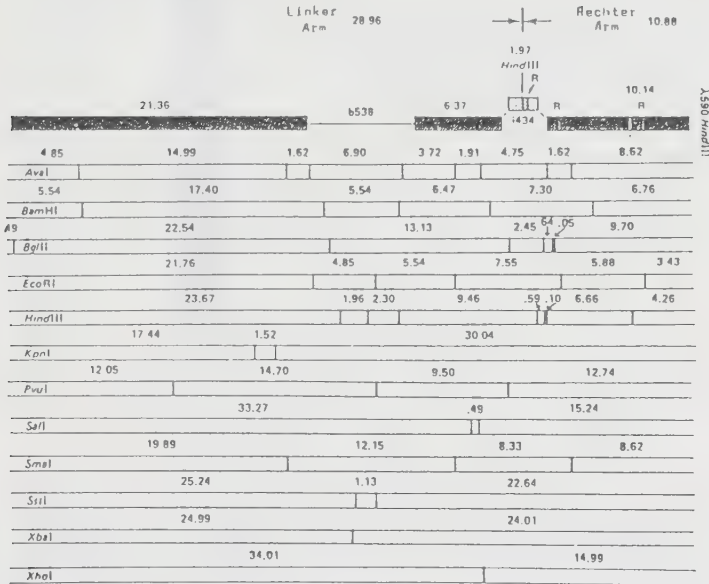


Abb. 2:

Das Genom von λ590 ist linear dargestellt. Zwischen den beiden cos-Enden sind jeweils die Schnittstellen einiger REN und die Größe der dabei entstehenden Fragmente (in kb) angegeben.

λ-590, verdaut mit PstI wurde auch als Längenstandard für DNA-Fragmente auf Agarosegelen verwendet. (Abb. 3)

Dictyostellium-library (λ47.1)

Diese Genbank ist uns großzügig von R. Chisholm überlassen worden. Der ursprüngliche Phage (Loenen, Brammer 1980)- Brammer L 47.1- ist ein spi- Substitutionsvektor, dessen "stuffer-fragment" zwischen zwei Bam H I Stellen entfernt wurde. DNA-Fragmente von Dictyostellium discoideum, die aus einem partiellen Sau 3 A-Verdau stammen, wurden einligiert, die so erhaltenen Phagen-DNA wurde in vitro verpackt und nach Infektion amplifiziert.

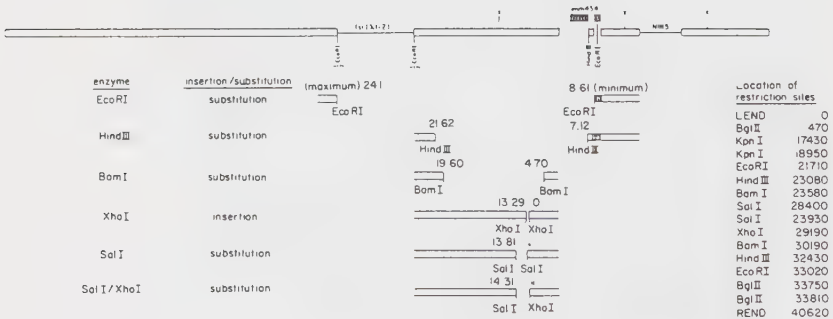
Nur Phagen, die ein fremdes DNA-Stück aufgenommen haben, sind auf E. coli Q 359 vermehrungsfähig.

Abb. 3

Längenstandard λ 590/ Pst I. Die Phagen DNA wird 22 mal geschnitten, die Längen der Fragmente sind der Abbildung zu entnehmen. 1/2 μ g DNA wurde auf ein Agarosegel (0.7%, 40mA, 4h) aufgetragen und unter UV-Licht photographiert (Blende 8, 12 sec). Banden kleiner als 500 bp sind selten zu sehen.



ca. 11 000 bp
ca. 7 000 bp
4 507 bp
2 838 bp
2 443 bp
1 986 bp
1 706 bp
1 159 bp
1 093 bp
805 bp
574 bp
468 bp
264 bp
215 bp
211 bp
200 bp
164 bp
150 bp
94 bp
87 bp
72 bp
15 bp



λ 47.1: Total length: 40.6 Kb

Abb. 4

Das Genom von λ 47.1 ist linear dargestellt. Die Schnittstellen einiger REN sind angegeben. Die Werte (in kb) entsprechen dabei den Entfernungen vom "linken" Ende des Phagen. Für einige REN wurde angegeben, ob sie zu einem Insertions- oder Substitutionsvektor führen.
(Aus: CSH-Labmanual, 1979, verändert)

Einzelstrangphagen M 13 mp8 und M 13 mp9

M 13 lagert sich an die F-Pili von *Escherichia coli* an, daher infiziert dieser Phage nur "männliche" Stämme (F⁺ oder hfr). Eine Infektion führt nicht zur Lysis, sondern die Phagen werden "ausgeschwitzt", was eine besonders saubere und einfache Präparation von ss-DNA erlaubt.

M 13 Phagen sind so konstruiert worden, daß sie zum einen einen Teil des *E. coli* Gens für β -Galaktosidase (*lac Z*) enthalten und so auf *lac*⁻ Mutanten nachgewiesen werden können, und außerdem in dieser *lac*-Region eine "multiple cloning site" enthalten, und dadurch die Insertion verschiedenster DNA-Fragmente erlauben. Jedoch Fragmente größer als 1000 bp neigen zur Instabilität. Die DNA des M 13 Phagens liegt nur während ihrer Replikationsphase innerhalb des Wirtsbakteriums kurzfristig doppelsträngig vor, in ihrer infektiösen Form ist sie einzelsträngig. Manipulierte DNA wird daher durch Transformation, wie Plasmide, in Zellen eingebracht, und nicht durch Infektion, wie *in vitro* verpackte λ -DNA (Transfektion).

M13mp8/pUC8

1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	7	8
Thr	Met	Ile	Thr	Asn	Ser	Arg	Gly	Ser	Val	Asp	Leu	Gln	Pro	Ser	Leu	Ala	Leu	Ala
ATG	ACC	ATG	ATT	ACG	AAT	TCC	CGG	TCC	GTC	GAC	CTG	CAG	CCA	AGC	TTG	GCA	CTG	GCC
<i>Eco RI</i>				<i>Sma I</i> <i>Xma I</i>			<i>Bam HI</i>		<i>Sal I</i> <i>Acc I</i> <i>Hinc II</i> <i>Hinc II</i>		<i>Pst I</i>		<i>Hind III</i> <i>Hinc III</i>					

M13mp9/pUC9

1	2	3	4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	5	6	7	8
Thr	Met	Ile	Thr	Pro	Ser	Leu	Ala	Ala	Gly	Arg	Arg	Ile	Pro	Gly	Asn	Ser	Leu	Ala
ATG	ACC	ATG	ATT	ACG	CCA	AGC	TTG	GCT	GCA	GGT	CGA	CGG	ATC	CCC	GGG	AAT	TCA	CTG
<i>Hind III</i>				<i>Pst I</i>		<i>Sal I</i> <i>Acc I</i> <i>Hind II</i> <i>Hinc II</i>			<i>Bam HI</i>			<i>Sma I</i> <i>Xma I</i>		<i>Eco RI</i>				

Abb. 5

Nukleotidsequenz der als "multiple cloning site" bezeichneten DNA-Sequenz. Die Erkennungsstellen der entsprechenden Enzyme sind angegeben. Dieselbe "multiple cloning site" ist auch in den Plasmiden pUC 8 und pUC 9 enthalten.

Die Restriktionsenzyme, die in diesem auch Polylinkerregion genannten DNA-Abschnitt schneiden, haben keine weitere Erkennungsstellen auf dem restlichen M 13 Genom (Gesamtlänge für M 13 mp8: 7.4 kb, für M 13 mp9: 7.9 kb). (Messing et al. 1977, Gronenbohm, Messing 1978, Messing, Vieira 1982)

Plasmide

pBR 322

pBR 322 ist -ebenso, wie die anderen Plasmide -ein extrachromosomales genetisches Element. Es liegt doppelsträngig und ringförmig geschlossen vor. Es unterliegt, wie die anderen hier vorgestellten Plasmide, in der Zelle einer sog. "relaxed control": Seine Kopienzahl liegt zwischen 10 und 200/Zelle, im Gegensatz zur sog. "stringent control", wo die Kopienzahl meist 1 beträgt. (Novick et al. 1976) Durch Stoppen der Proteinbiosynthese des Wirts (z.B. Zugabe von Chloramphenicol) läßt sich die Kopienzahl bei "relaxed" Plasmiden auf bis zu mehrere Tausend hochtreiben (Clewett et al. 1972). pBR 322 codiert für zwei Resistenzen: Ampicillin- und Tetracyclinresistenz (Bolivar et al. 1977).

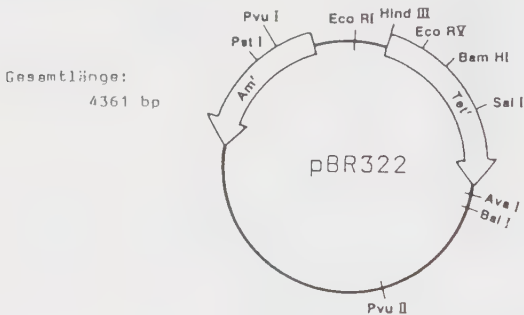


Abb. 6

Schematische Darstellung des Plasmids pBR 322 mit Angabe der Schnittstellen einiger REN und der Resistenzbereiche.

Durch Clonierung eines Inserts in ein Resistenzgen geht diese Resistenz verloren, und so wird das Plasmid selektionierbar.

Die komplette Sequenz des Plasmids ist bekannt (Sutcliffe 1978). Der bevorzugte Wirt in unserem Labor ist der Stamm HB 101, der rec A⁻ ist.

pUC 8 und pUC 9

Zusätzlich zu den M 13 Vektoren haben Messing und seine Mitarbeiter (s.o.) zwei Plasmide entwickelt, die dieselbe "multiple cloning site" enthalten. Eine Insertion fremder DNA in eine dieser 9 Stellen kann durch das Auftreten von weißen Kolonien - das β -Galaktosidasegen liefert dann kein funktionsfähiges Protein mehr - auf einem Hintergrund von blauen Kolonien auf entsprechenden Indikatorplatten nachgewiesen werden. Die β -Galaktosidasesynthese

se von Plasmiden, die das unversehrte lac Z-Gen enthalten, wird durch die Zugabe von IPTG induziert und verstärkt. gal⁻-Kolonien können auf Platten, die X-gal enthalten, leicht durch das Auftretendes blauen Abbauprodukts (Bromo-chloro-indol) identifiziert werden.

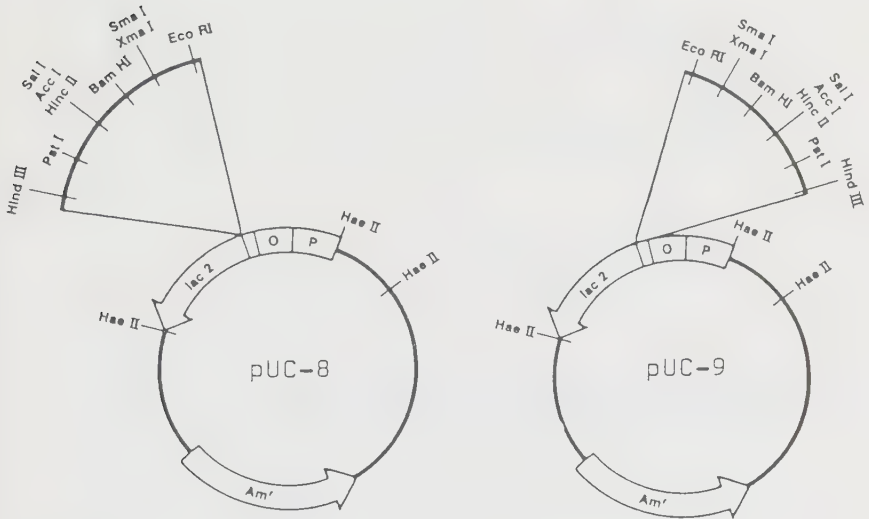


Abb. 7

Schematische Darstellung der Plasmide pUC 8 und pUC 9 mit ihrer "multiple cloning site" im lac Z-Gen.

pUC 8 und pUC 9 können relativ große DNA-Fragmente stabil aufnehmen, sind leicht selektionierbar und eignen sich durch die hohe Zahl eng zusammenliegender singulärer Erkennungsstellen für REN gut zu Reclonierungsversuchen.

yRP 17

yRP 17 ist ein sog. "shuttle vector". Er ist sowohl in *E. coli* als auch in Hefe propagierbar. Dieser Hybrid- Vektor ist ein Derivat von yRP 12 (Scherer, Davis 1979) in dem die EcoRI-Schnittstelle nahe dem amp^r -Gen auf dem 1.45 kb langen Hefefragment, das für trp^1 und ars^1 codiert, eliminiert wurde. Dieser Vektor dient meist zu in vivo Expressionsstudien (Clonierung in Prokaryoten, Expression in Eukaryoten).

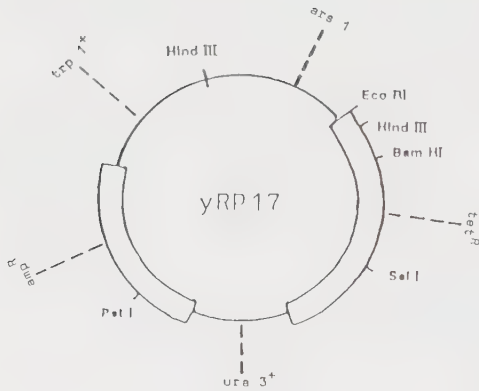


Abb. 8

Schematische Darstellung des Plasmids yRP 17 mit den Schnittstellen einiger REN und der Lage der Resistenzgene. Die mit  bezeichneten Abschnitte stehen für pBR 322 Sequenzen, die mit  bezeichneten Abschnitte für Sequenzen aus Hefe.

Chemikalien

Medienbestandteile

Pepton, Hefeextrakt, Bacteriol. Agar Oxoid, Wesel
 Bactotrypton, Yeastextract Difco Laboratories, Detroit MI, USA
 Maltose E. Merck, Darmstadt

Antibiotika

Streptomycin, Ampicillin, Tetracyclin, Chloramphenicol waren Geschenke der Firmen Boehringer, Mannheim, Farbwerke Hoechst AG, Hoechst und Hoffmann-La Roche, Grenzach.

Anorganische Salze sowie Einfache organische Verbindungen (Puffersubstanzen, Lösungsmittel) waren, soweit nicht speziell aufgeführt, vom Reinheitsgrad "pro analysi" und wurden von günstigen Anbietern bezogen.

Diverses

IPTG, X-Gal, DMSO, Glyoxal, Ethidiumbromid, DTT, PMSF
 Sigma Chemicals Corp., St. Louis Miss. USA
 "bind silane", "repel silane" LKB Bromma Schweden
 Proteinbestimmungsreagenzien, SDS (ultrapure) Biorad Richmond USA
 p-Nitrophenylphosphat Boehringer Mannheim
 Dimethyl-POPOP, PPO Zinsser Frankfurt
 Na-Deoxycholat Serva Feinbiochemika, Heidelberg

Gelbestandteile

Acrylamid, PODS C. Roth KG, Karlsruhe
 N,N'-Methylenbisacrylamid, TMED Serva Feinbiochemika, Heidelberg
 Agarose Sigma Chemical Corp., St. Louis Miss USA
 Harnstoff Janssen Chimica, Beerse, Belgien

Säulenmaterialien

AH-Sephadex, CN-Br aktivierte Sephadex, Sephadex G 150, Sephadex G 75, Sephadex G 25, CL-6 B Sephadex, Aca 44 Pharmacia AB, Uppsala, Schweden
 DE-52 Whatman, Maidstone, England
 BD-Cellulose Boehringer, Mannheim
 RPC-5 (Technik und Bereitung des Materials nach Pearson et al. 1971) Adogen 464 Ashland Chemical Corp., Columbus, USA
 Résines Voltalef 300 LD-PL micro Ugué Kuhlmann, Frankreich

Radioaktivität

Die radioaktiven Substanzen stammen von den Firmen Amersham, Braunschweig und New England Nuclear, Boston, USA (x) und wurden in folgenden Aktivitäten geliefert:

	Ci/ mmol	mCi/ml		Ci/mmol	mCi/ml
^3H -Asn (x)	22	1	^{14}C -Asn	105	0.05
^3H -Val	25	1	^3H -GDP	14	1
^3H -GTP	18	0.05	^3H -UTP (x)	36	1
α - ^{32}P -dATP	3000, 7000	10	^{32}P -Cp	3000	10
α - ^{32}P -GTP	410	10	$^{\text{K}}^{125}\text{J}$	50 000	100

Enzyme

	Aktivität	Bezugsquelle
CAP(nachgereinigt)	0.2u/ ul	Boehringer, Mannheim
T ₄ -DNA-Ligase	1000u/ ml	"
T ₄ -RNA-Ligase	1800u/ ml	PL-Pharmacia Biochemicals, Uppsala, Schweden
DNA-Polymerase (gr.Fragment, Klenow)	5000u/ ml	Boehringer, Mannheim
DNA-Polymerase ("whole enzyme")	4500u/ ml	"
BAL 31	430; 1000u/ ml	New England Biolabs, Beverly MA, USA
Lysozym, DNase I, pankreatische RNase(DNase-frei)		Boehringer, Mannheim

Restriktionsendonucleasen

	Schnittstelle (5'-3')	Puffer	B-ME (6 mmol)	Aktivität (u/ ml)	Bezug
Alu I	AG/CT	N2	+	1500	Boe
Bam H I	G/GATCC	N3(N2)	+	12000	Boe
Bcl I	T/GATCA	No (60mmol K ⁺)	+	18200 (50°)	Boe
Cla I	AT/CGAT	No	-	2000	Boe
Dde I	C/TNAG	N2	+	10000	Biolabs
Eco R I	G/AATTC	N4(N2)	-	100000	Boe
Hae II	PuGCGC/Py	No	+	3000	Boe
Hae III	GG/CC	N1	-	11900	Boe
Hha I	CCG/C	N2	+	16000	PL
Hind II	GTPy/PuAC	N2	+	2500	Boe
Hind III	A/AGCTT	N2	-	14000	Boe
Hinf I	G/ANTC	N2	+	8000	Biolabs
Ipa II	C/CGG	No (60mmol K ⁺)	+	4100	Boe
Mbo I	/GATC	N2	+	10000	Biolabs
Pst I	CTGCA/G	N2	+	7900	Boe
Sal I	G/TCGAC	N3	+	9000	Boe
Sau 3 A	/GATC	N2	-	2000	Biolabs
Sma I	CCC/GGG	No (60mmol K ⁺)	+	12000	Boe
Taq I	T/CGA	N1	+	5000 (65°)	Boe

Boe: Boehringer, Mannheim; PL: PL-Pharmacia Biochemicals, Uppsala, Schweden; Biolabs: New England Biolabs, Beverly, MA, USA

Chromatographiezubehör

Zur Säulenchromatographie wurden handelsübliche Säulen der Firmen Laborcenter, Erlangen, LKB, Bromma, Schweden und Bio-Rad, Richmond, USA verwendet.

Gradientenmischer: LKB 11300 Ultrograd, LKB, Bromma, Schweden.

Fraktionensammler: Ultrarac LKB, Bromma, Schweden.
 Peristalt. Schlauchpumpe: Perplex 10-200 " " "
 Schlauchpumpen: Gilson Minipuls 2, Abimed Analysetechnik, Düsseldorf
 Photometer: Uvicord S II, LKB, Bromma, Schweden
 Schreiber dazu: 1-Kanal Recorder, desgl.

Radioaktivitätsmessung:

Tricarb-Flüssigszintillationszähler 2660 und 3385, Packard, Downers Grove, USA. Die verwendeten Szintillationslösungen: gefüllte nicht-wässrige Proben: PPO 5g, Dimethyl-POPPO 0.3g, Toluol ad 1l
 Durchflußzähler: Berthold, Wildbad

Sonstige Arbeitsgeräte

Aufschlußgeräte: Microdismembrator II, Braun, Melsungen; Ultraschallgerät Sonifier B-12, Branson Sonic Power Corp., Danbury, Conn. USA
 Ultraschallconverter " " "
 Netzgeräte Ieco 493 Ieco, Lincoln, USA
 Macrodrive constant power supply, LKB, Bromma, Schweden
 Elektrophoreseapparaturen Werkstatt des Instituts
 Rotationszentrifugalmaschine New Brunswick Scientific Comp., Edison, USA
 Schüttelwasserbad HT Infore, Basel, Schweiz
 Spektralphotometer UV-210 A Shimadzu, Kyoto, Japan
 PMQ III Zeiss, Oberkochen

Zentrifugen

Tischzentrifuge Sarstedt, Nümbrecht; Eppendorf,
 Rotosilenta KS Hettich, Tuttlingen; RC-5B DuPont, Newton, USA; TGA-50 und TGA-65 (Rotoren: TST 28.38, TST 41, TST 45, TFT 65.13 und TFT 65.38) Kontron, Zürich, Schweiz; Sorvall SS3 Automatic DuPont de Nemours, Bad Nauheim

Lyophilisator Speedvac concentrator Uni Equip, München
 Dampfsterilisationsgerät Webege Webecke & Co. Bad Schwartau
 (1.2 atm, 120°C, 20 min)

Binocular Leitz, Wetzlar

Whirlmix Cenco Instrumenten, Oreda, Holland
 UV-Lichtkasten Ultraviolet Produkte San Gabriel, Cal., USA
 Sofortbildkamera Cu-5 Polaroid, USA
 Sterilfilter 0.2 um und 0.4 um Porendurchmesser, Papierfilter, Nitrocellulosefilter (NC-Filter), Glasfaserfilter Nr.0, Einmalfilterhalter 0.22 um und 0.4 um Porendurchmesser Schleicher & Schüll, Dassel
 Inkubationsgefäße, Pipettenspitzen, Gaspipetten, Spritzen, Nadeln und andere Kleinteile Laborcenter, Erlangen

Verstellbare Mikropipetten Pipetman

Hybridisations Transfer Membran, Gene-ScreenTM, NEN New England Nuclear, Boston, USA
 Roentgenfilme X-Omat, NS-2T Kodak, USA
 Dialysiereschläuche Visking C.Roth, Karlsruhe
 Klipse-Verschlüsse dazu Closures Spectrum Medical Ind., Los Angeles, USA

PUFFER

Puffer A: Tris/HCl (pH 8) 20mM, MgCl₂ 3mM, O-ME 0.05%(v/v), Na₂EDTA 1mM

2 x BAL-Puffer: CaCl₂ 24 mM, MgCl₂ 24mM, NaCl 600mM, Tris/HCl (pH 8.0) 40mM, Na₂EDTA 2mM

"Chloroform": Chloroform/isoamylalkohol (24:1 v,v)

Puffer für EF-Tu-Säule

EF-Tu-Puffer: Tris/HCl (pH 7.6) 50mM, MgCl₂ 10mM, DIT 0.5mM, PMSF 50µM, NaN₃ 1mM

Bindungstestpuffer: Tris/HCl (pH 7.6) 50mM, MgCl₂ 10mM, NH₄Cl 150mM, DIT 2.5mM

Bindungstestwaschpuffer: Tris/HCl (pH 7.6) 10mM, MgCl₂ 10mM

Kopplungspuffer: Borat/NaOH (pH 8.3) 100mM, NaCl 500mM, MgSO₄ 10mM, DIT 1mM, GDP 10µM

Blockierungspuffer: Glycin (pH 8.0) 200mM, NaCl 300mM, MgSO₄ 10mM, DIT 1mM, GDP 10µM

Waschpuffer sauer		Waschpuffer basisch	
Tris/HCl (pH 6.9)	100mM	Borat/NaOH (pH 9.8)	100mM
NaCl	500mM	NaCl	500mM
MgSO ₄	10mM	MgSO ₄	10mM
DIT	1mM	DIT	1mM
GDP	100µM	GDP	100µM

IK I Hepes (pH 7.6)		IK II Hepes (pH 7.6)	
NH ₄ Cl	50mM	NH ₄ Cl	10mM
KCl	50mM	KCl	10mM
MgCl ₂	10mM	MgCl ₂	10mM
DIT	1mM	DIT	1mM
GTP	1mM	GTP	50µM

IP Hepes (pH 7.6)		IS Borat/NaOH (pH 8.1)	
NH ₄ Cl	50mM	NaCl	1000mM
KCl	150mM	MgCl ₂	10mM
MgCl ₂	10mM	DIT	1mM
DIT	1mM	GTP	50µM
GTP	50µM		

Aktivierungsansatz (als 5fache Stammlösung): Tris/HCl (pH 7.6) 50mM, NH₄Cl 50mM, KCl 50mM, MgCl₂ 10mM, DIT 5mM, PEP 5mM, GTP 1mM

Alle GTP- oder GTP-haltigen Lösungen werden erst unmittelbar vor Benutzung den Puffern zugesetzt!

Puffer für Elektrophoresen

10x TBE	Tris 2 M	10x TEB	Tris 0.8 M
Na ₂ EDTA	40mM	Na ₂ EDTA	10 mM
Borsäure	1 M	Borsäure q.s. (~0.4 M)	
		Mit Borsäure auf pH 8.3 einstellen.	

Auftragspuffer hierfür: Formamid (80 %), TBE 1x, BPB 0.1% XCFF 0.1%

50x E-Puffer Tris/Acetat (pH 7.9) 2 M
Na-Acetat 0.25M
Na₂EDTA 2mM

Auftragspuffer hierfür: Sucrose (50 %), EDTA (pH 8.0) 0.1M BPB 0.1%, XCFF 0.1%

HMK: Hepes/NH₃ (pH 7.5) 50mM, MgCl₂ 40mM, KCl 20mM

HMK-1: HMK + Triton X-100 4%(w/v), Sucrose 5%(w/v)

HMK-2: HMK-1 jedoch Sucrose 22%

HMK-3: HMK + Sucrose 10%

I-Puffer: KCl 70mM, MgCl₂ 7mM, Tris/HCl (pH 7.4) 10mM, DIT 2.5mM, PVP 1%

low TE: Tris/HCl (pH 8.0) 10mM, Na₂EDTA 0.1mM

M₁-Puffer: Tris/HCl (pH 7.5) 7mM, Spermidin (pH 7.0) 35mM, Putrescin (pH 7.0) 70mM, MgCl₂ 20mM, ATP (pH 7.0) 1mM, O-ME 25uM

NP-40-Puffer: Mg-Acetat 10mM, NaCl 10mM, Hepes/NH₄OH (pH 7.5) 30mM, Saccharose 10%, NP 40 2%,

PBS-Puffer: (phosphat buffered saline) KCl 10mM, NaCl 10mM, Na₂HPO₄ 15mM, KH₂PO₄ 30mM

"Phenol": mit low TE gesättigtes Phenol (1:4 v/v), zu gleichen Teilen mit "Chloroform" gemischt.

Phosphatpuffer: KH₂PO₄ 14.7mM, Na₂HPO₄ 2mM, pH 6.0

"Prehybrid-Puffer"

DNA-"prehybrid-Puffer"		RNA-"prehybrid-Puffer"	
Formamid	50 %	Formamid	50 %
BSA (y)	0.04 %	SSC	4 x
Ficoll (y)	0.04 %	KNaHPO ₄ (pH 6.8)	0.1 M
PVP (y)	0.04 %	SDS	0.5 %
SSC	5 x		
SDS	1 %		

Mit Wasser oder Probe auffüllen

(y) = sterilfiltrierte 25x
Stocklösung

Priming Puffer: MgCl₂ 10mM, Tris/HCl (pH 8) 5mM

10 fach Puffer für REN

N0	Tris/HCl (pH 7.5)	100mM	N1	Tris/HCl (pH 7.5)	100mM
	MgCl ₂	100mM		MgCl ₂	100mM
	Gelatine	1mg/ml		NaCl	60mM
N2	Tris/HCl (pH 7.5)	100mM		Gelatine	1mg/ml
	MgCl ₂	100mM	N3	Tris/HCl (pH 7.5)	100mM
	NaCl	600mM		MgCl ₂	100mM
	Gelatine	1mg/ml		NaCl	1500mM
N4	Tris/HCl (pH 7.5)	1 M		Gelatine	1mg/ml
	MgCl ₂	50mM			
	NaCl	500mM		Zusätze: (sterilfiltriert)	
	Gelatine	1mg/ml		Spermidin	40mM
				O-ME	60mM

RPC-5 Puffer: Na-Acetat 10mM, Mg-Acetat 10mM, pH 4.5

Für Säulenelution mit NaCl-Zusatz 0.4 M-1.0 M

20x SSC: NaCl 3 M, Na citrat (pH 7.0) 0.3M

20x SSPE: NaH₂PO₄ (pH 7.4) 0.2M, NaCl 3 M, Na₂EDTA 0.02M

Synthesepuffer: Tris/HCl (pH 7.8) 20mM, KCl 20mM, MgCl₂ 10mM, O-ME 50mM

TEN-Puffer: Tris/HCl (pH 7.5) 10mM, EDTA (pH 7.5) 1mM, NaCl 0.2M, NaH₃ 0.2%

TES: Tris/HCl (pH 7.5) 20mM, NaCl 10mM, Na₂EDTA 0.1mM

TMS: Tris/HCl (pH 7.5) 10mM, MgCl₂ 10mM, Na₂S₂O₃ 3mM

Für Säulenelution mit NaCl-Zusatz 0.2-1.0 M

T₄-Pol-Puffer: KOAc 666mM, Tris/HOAc (pH 7.8) 333mM, Mg(OAc)₂ 100mM

Transformationspuffer: Tris/HCl (pH 7.5) 10mM, MgCl₂ 10mM, CaCl₂ 10mM

MEDIEN

Dicty-Medium (Watts, Ashworth 1970)

Pepton 14.3 g/l, Hefeextrakt 7.15 g/l, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.28 g/l, KH_2PO_4 0.49 g/l, Maltose 18.0 g/l (getrennt sterilisieren), Streptomycin 0.20 g/l (nach Sterilisation zusetzen)

YT-Medium Bactotrypton 10.0 g/l, Yeastextract 5.0 g/l, NaCl 5.0 g/l

YT-Agar enthält zusätzlich noch 1.2 bzw. 0.7% Agarose

YT(mal)-Medium (für Phagenaufzucht) enthält zusätzlich 6.0 g/l Maltose, die getrennt sterilisiert wird)

Grosskulturmedium (Auftragszüchtung im Fermenter) Pepton 100 g/20 l, Lab Lemco Powder 160 g/20 l, NaCl 100 g/20 l, Glucose 40 g/20 l

M9-Medium 1) Salze (als 20fache Stammlösung): NH_4Cl 1 g/l, Na_2HPO_4 2 g/l, KH_2PO_4 3 g/l, NaCl 5 g/l 2) Casaminoacids (Difco) 10 g/l 3) Getrennt sterilisierte Zusätze 1M MgSO_4 0.4 ml/l, 50mM CaCl_2 2 ml/l. 40% Glucose 5 ml/l, 10 mg/ml Thiamin 1 ml/l

SM-Medium NaCl 5.8 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 g/l, 1M Tris/HCl (pH 7.5) 50 ml/l, 2% Gelatine 5 ml/l

5. METHODEN

5.1. Züchtungen

5.1.1. Dictyostelium discoideum

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Mutante des Wildtyps NC-4 von Dictyostelium discoideum, der axenisch wachsende Stamm AX-2-216 verwendet. Der Stamm AX-2 wurde in dem von Watts und Ashworth (1970, Pistel 1982) beschriebenen Medium gezüchtet (HL-5 Medium). Um eine ausreichende Belüftung zu gewährleisten, wurden die Kolben nur zu 20 bis 50% des Nennvolumens gefüllt. Die Zellen wurden in Erlenmeyerkolben bei 22°C in einer Rotationsschüttelmaschine mit 180 Upm geschüttelt. Die Zelldichte wurde durch Auszählen in einer Fuchs-Rosenthal-Kammer festgestellt. Aus der im kleinsten Feld bestimmten Anzahl von Zellen läßt sich mit Hilfe des Faktors

$$x \cdot \frac{16 \cdot 16}{3.2} \cdot 10^3 = n \quad ; \quad n = x \cdot 8 \cdot 10^4$$

x: ausgezählt im kleinsten Feld
n: Zelldichte/ml

die Zelldichte pro ml berechnen. Unter diesen Zuchtbedingungen liegt die Generationszeit bei 8 Stunden, so daß sich mit folgender Formel

$$ml_v = \frac{n}{0.0885 \cdot t} \cdot ml_k \quad ; \quad \begin{array}{l} ml_v: \text{ml, zuzunehmen aus der Vorkultur} \\ ml_k: \text{Volumen der Hauptkultur} \\ n: \text{erwünschte Zelldichte bei der Ernte} \\ n_0: \text{Zelldichte zum Zeitpunkt der Zählung} \end{array}$$

das nötige Animpfvolumen berechnen läßt. Logarithmisch wachsende Kulturen vegetativer Amöben wurden bei einer Zelldichte von $3-4 \times 10^6$ Zellen pro ml durch dreiminütige Zentrifugation mit 850 g (für 250 ml Vol) bzw. 8 min mit 1000 g (für 1 l Vol) bei 4° geerntet. Die Zellen wurden mit 20 bis 50% des ursprünglichen Volumens Phosphatpuffer gewaschen. Stationäre Kulturen hatten eine Zelldichte von $1,5 - 2 \times 10^7$ Zellen/ml.

Zellen aus der logarithmischen Phase, die in "synthetischem" Medium (Ott et al. 1982) mit und ohne Queuin-Zusatz gewachsen waren, wurden mir von G. Ott zur Verfügung gestellt.

5.1.2. Bakterien

E.coli MRE 600 wurde in Großkultur im Fermenter gezüchtet. Bei ca. $0,5 A_{600}$, was einer Zelldichte von 4×10^8 Zellen /ml entspricht, wurden die Kulturen geerntet.

Auch bei allen anderen Bakterienzüchtungen wurde das Wachstum durch Messung der optischen Dichte der Kulturen bei 600 nm verfolgt. Die Züchtung dieser Stämme erfolgte im YT-Medium oder, falls sie als Wirte für λ -Phagen (plating cells) vorgesehen waren, im YT(mal)-Medium. Maltose induziert die Bildung einer antigenen Determinante an der Zelloberfläche des Bakteriums, die die Anheftung der Phagen wesentlich erleichtert. Die Ernte erfolgte, soweit nicht anders angegeben, in der stationären Phase bzw. bei infizierten Kulturen nachdem Lysis aufgetreten war.

5.1.2.1. "Plating cells"

"Plating cells" dienen als gut infizierbare Wirte von Phagen. Dazu werden die entsprechenden Stämme in 5 ml YT (BHB 3000, JM 103) oder YT(mal) (Q 359) über Nacht bei 37°C angezüchtet, 5 min bei 5000 Upm in einem SS-34 Rotor zentrifugiert und im gleichen Volumen einer 10 mmol MgSO_4 -Lösung suspendiert. Eine solche Suspension ist etwa eine Woche zu verwenden. Für die Phagenaufzucht verwendete Medien und Top-agar-Mischungen waren alle 10 mM an Magnesium.

5.2. Isolierung von Zellbestandteilen

5.2.1. Polysomen von *Dictyostelium discoideum*

Die verschiedenen Fraktionen (Zellkerne, Polysomen, Monoribosomen, Cytosol) wurden durch Differential- und Dichtegradientenzentrifugation nach Cocucci und Sussman (1970) modifiziert nach Pistel (1982) erhalten.

5.2.2. Präparation von tRNA aus *Dictyostelium discoideum*

Die Präparation wurde mit kleinen Änderungen nach Pistel (1982), Palatnik et al. (1977) durchgeführt.

5.2.3. Anreicherung von tRNA^{Asn}-Isoacceptoren

Nach dem von T.Dingermann (1980) vorgeschlagenen Schema wurden die Isoacceptoren angereichert. 1300 A₂₆₀ Gesamt-tRNA wurden auf eine in TMS equilibrierte BD-Cellulosesäule (Bettvolumen 1,1 cm x 40 cm, 4°C, Fluß 30 ml/h) aufgetragen. Folgender Natriumchloridgradient wurde mit dem Gradientenmischer gefahren: eine Stunde 0,4 M, 5 Stunden 0,4-0,6 M, eine Stunde 0,6 M, 11 Stunden 0,6-2,0 M, 6 Stunden 2,0 M). Die eluierten Fraktionen wurden mit einem Suchtest auf Beladbarkeit mit Asn getestet. Es wurde jede dritte Fraktion getestet.

Suchtest: Ansatzvolumen 100 ul	Ansatzkonz.
Na-cacodylat pH 7,5	100 mM
ATP	5 mM
Mg-chlorid	10 mM
Spd	2 mM
¹⁴ C-Asn	10 uM
Enzym (S-30 12 mg/ml)	60 ug
Fraktions-Aliquot	30 ul
(Fraktionsvolumen 3 ml)	

Inkubation 50 min bei 22 °C.

Entnommene Aliquots (50 ul) wurden auf Papierfilter pipettiert und in 10 % TCA (4°C) gefällt. Die Plättchen wurden dreimal in 5 % iger TCA, dreimal in

Ethanol und einmal in Ether in der Kälte gewaschen, getrocknet (15 min bei 80°C) und in 5 ml Toluolszintillator gezählt. Die tRNA wurde ethanolgefällt und in RPC-5 Puffer gelöst. Es wurden 3 Pools angelegt; zwei davon, die die Isoacceptoren tRNA^{Asn}₂ bzw. tRNA^{Asn}₃ enthielten, wurden anschließend noch über eine RPC-5 Säule (Bettvolumen 2 cm x 150 cm, Raumtemperatur, Fluß 30 ml/h) an einem linearen NaCl-Gradienten von 0,4 molar auf 1,0 M. getrennt. Die tRNA^{Asn}-haltigen Fraktionen wurden anhand eines Suchtests gepoolt.

5.2.4. Analytische Trennung von aminoacylierten tRNAs

Die radioaktiv markierte tRNA (0.1-2.0 A₂₆₀) wurde mit einem nicht linearen Kochsalzgradienten (vergl. Abb. 10 S. 60) von 0,4-0,8 M NaCl in RPC-5 Puffer an einer RPC-5 Säule (Bettvolumen 1,4 x 20 cm) mit einem Durchfluß von 24 ml/h getrennt und in 15 min Fraktionen gesammelt.

Die Fraktionen wurden mit den gleichen Volumina 10 %iger TCA versetzt und auf Glasfaserfilter filtriert. Es wurde dreimal mit 5 %iger TCA (4°C), dreimal mit Ethanol und einmal mit Ether gewaschen, getrocknet (15 min, 80°C) und in 5 ml Toluolszintillator gezählt. Die Umrechnung der ausgedruckten cpm in pmol erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{pmol} = \text{cpm}_{\text{korrt}} \cdot \frac{100}{z} \cdot \frac{1}{2.22 \cdot 10^{12}} \cdot \frac{1}{A} \cdot \frac{V}{v}$$

cpm_{korrt}: cpm, um Leerwert korrigiert

z : Zählrohrabgabe in %, → dpm

A : spezifische Aktivität

V : Ansatzvolumen

v : Entnahmenvolumen

5.2.5. Trennung von tRNA durch 2D-PAA-Gelelektrophorese

Das von Dingermann (et al. 1979, Fradin et al. 1975) angewendete Verfahren wurde nur leicht verändert (vgl. auch F. Pistel 1982 und G. Ott 1984).

5.2.6. Reindarstellung von tRNA-Isoacceptoren durch Affinitätschromatographie

Die Methode wurde von Derwenskus et al. (1984) beschrieben und weitgehend beibehalten.

5.2.6.1. Deacylierung der tRNA

Gesamt-tRNA (Bulk-tRNA) wurde nach der Methode von Schofield und Zamecenik (1968) vollständig deacyliert. Dazu wurden 50-100 A₂₆₀ tRNA 15-30 min bei 30°C in einem 400 µl Ansatz incubiert, der 100 mM an Tris/HCl (pH 7,5) und 32,5 mM an CuSO₄ war. Kupferionen wurden durch dreimaliges Fällern mit Ethanol in Gegenwart von EDTA (10 mM) in einem sauren Milieu (Natriumacetat pH 5,5, 200 mM) entfernt. Nach einer abschließenden Incubation in Natriumacetat pH 5,5 (10 mM) und Magnesiumchlorid (10mM) für 10 min bei 50°C wurde die Lösung langsam abgekühlt und bei -20°C gelagert.

5.2.6.2. Aminoacylierung von tRNA^{Asn}

Ein typischer Aminoacylierungsansatz bei einem Volumen von 35 µl (für 0,1-1,5 A₂₆₀ bulk tRNA) hatte folgende Zusammensetzung:

Natriumcacodylat	86 mM
MgCl ₂	6 mM
tRNA	0,1-1,5 A ₂₆₀
Aminosäure	20 µM
ATP	6 mM
Spermidin	2 mM
Enzym (S-100)	30 µg
(tRNA-frei)	

Die Beladung wurde durch Entnahme eines Aliquots analog 5.2.3. überprüft.

5.2.6.3. Aktivierung und Beschickung der EF-Tu-säule

Die Sepharose-säule, an die der Elongationsfaktor Tu (EF-Tu) von *E. coli* (5.2.10.2.) kovalent gebunden war, wurde mit TK I equilibriert, und mit 2,5 ml Aktivierungspuffer (entsprechend dem Bettvolumen von 5 ml (0,8 cm x 10 cm)) beschickt. Der Fluß betrug während der ganzen Prozedur - ausgenommen die Incubationsperioden - 6 ml/h. Nun wurde die Säule abgeklemmt und senkrecht in einem Wasserbad 10 min bei 37°C vorincubiert. Anschließend wurde die aminoacylierte tRNA aufgetragen und 10 min mit TK II nachgespült. Danach wurde erneut 10 min jedoch bei 4°C incubiert. Nun wurde die Säule mit TK II equilibriert.

5.2.6.4. Chromatographie an EF-Tu

Der Fortgang der Chromatographie wurde anhand des Transmissionspektrums auf einem Schreiber verfolgt. Nach Erreichen der Basislinie wurde mit IP-Puffer zwischengeschpült und schließlich erneut mit TK II equilibriert. Die aminoacylierte tRNA wurde mit HS-Puffer abgelöst. Die tRNA wurde mit Ethanol präcipitiert, in RPC-5-Puffer gelöst und auf eine RPC-5-Säule aufgetragen. Analog der in 5.2.4. beschriebenen Methode wurden darauf die Isoacceptoren getrennt. Dieser Lauf wurde sowohl durch Absorptionsmessung als auch durch Messung der Radioaktivität in einem Durchflußzähler verfolgt.

5.2.6.5. Konzentrierung der tRNA-Isoacceptoren

Das Volumen des Eluats der jeweiligen Isoacceptoren war relativ groß (ca. 50 ml). Daher wurde dieses Eluat mit RPC-5-Puffer (ohne NaCl) auf eine Molarität von < 0,3 M NaCl verdünnt und auf eine DE-52-Minisäule aufgetragen. Eine 1 ml fassende Plastikpipettenspitze war mit Glaswolle gestopft und mit aufgeschlammtem DE-52 Material gefüllt worden (Bettvolumen 200 ul). Nach zweimaligem Auftragen und Abzentrifugieren von je 100 ul RPC-5-Puffer (1 M NaCl) lagen die spezifischen tRNA^{Asn}-Isoacceptoren in 200 ul Volumen vor, aus dem sie mit Ethanol gefällt werden konnten.

5.2.7. Genomische DNA von *Dictyostelium discoideum*

5.2.7.1. Gesamt-DNA von *Dictyostelium discoideum*

Gesamt-DNA wurde nach einer Methode von Murray, Tompson (1980) präpariert. *Dictyostelium discoideum* wurde bei $6-8 \times 10^6$ Zellen/ml geerntet. Durch Zugabe von 3 ml (1,5 ml pro 1 l Kultur) HMK I und 4 % (v/v) Triton-X-100 und einminütiges Mischen auf dem Whirlmix wurden die Zellen aufgeschlossen. Anschließend wurden durch fünfminütiges Zentrifugieren bei 10 000 g die Kerne pelletiert. Diese wurden in 6 ml einer Lösung, die EDTA (0,5 M pH 8), SDS (1 %) und Proteinase K (100 µg/ml) enthielt, durch dreistündige Incubation bei 50⁰ unter gelegentlichem vorsichtigem (!) Mischen aufgeschlossen. Anschließend wurde das Protein mit den gleichen Volumen "Phenol" extrahiert. Das Durchmischen der wässrigen Phase und des "Phenols" hat möglichst vorsichtig zu geschehen, um ein Scheren der DNA zu vermeiden. Die Phasen wurden durch 10 min Zentrifugation bei 5 000 g getrennt. Die untere Phase wird erneut mit "Phenol" extrahiert. Die wässrigen Phasen wurden vereinigt und mit "Chloroform" wurde das Phenol daraus extrahiert. Das Volumen der DNA-Lösung wird auf 4 ml eingengt und auf einen CsCl-Gradienten aufgetragen (vgl. Plasmid-Präparation). Setzt man während der Zentrifugation Ethidiumbromid zu, so ist eine rote Bande im UV-Licht sichtbar, jedoch ist das Ethidiumbromid schwer aus der präparierten DNA zu entfernen.

5.2.7.2 Reine Kern-DNA von *Dictyostelium discoideum* (frei von mitochondrialer DNA)

Um reine Kern-DNA darzustellen, wurden zunächst die Kerne nach dem Aufschluß durch ein 2,3 M Sucrosekissen zentrifugiert und so gereinigt (Firtel, Bonner 1972). DNA wurde aus den Kernen extrahiert und gereinigt wie von Firtel und Lodish (1973) beschrieben.

5.2.8. Isolierung von Aminoacyl-tRNA-Synthetasen von *Dictyostelium discoideum*

5.2.8.1. Präparation tRNA-freier S-100 -, S-78 - und S-30 -Extrakte.

Zellen wurden bei einer Zelldichte von $2-3 \times 10^6$ geerntet. Alle Arbeiten wurden bei 4°C nach der bei Pistel (1982) beschriebenen Vorschrift durchgeführt. Nach dem Dismembratoraufschluß, der bei Ott (1984) beschrieben ist, wurden der rohe Enzymextrakt 10 min bei $10\,000 \times g$ zentrifugiert. Ein S-30 wurde durch 30 min Zentrifugation bei $30\,000 \times g$, ein S-78 durch einstündige Zentrifugation bei $78\,000 \times g$ und ein S-100 bei $100\,000 \times g$ erhalten. Alle so erhaltenen Enzymextrakte wurden auf eine DEAE-Cellulose-Säule (equilibriert mit Synthetasepuffer ($0,2\text{ M}$ an NaCl), Bettvolumen $5\text{ cm} \times 10\text{ cm}$, Fluß $20-30\text{ ml/h}$) aufgetragen, mit dem gleichen Puffer eluiert und so tRNA-frei gemacht. Gesamtzymextrakt wurde abschließend mit 85% Ammonsulfatsättigung (4°C) gefällt, der Niederschlag in Synthetasepuffer gelöst und gegen Synthetasepuffer dialysiert.

5.2.8.2. Anreicherung der tRNA^{Asn}-spezifischen Synthetasen

Nach der DE-52-Chromatographie wurde der Extrakt einer fraktionierten Ammonsulfatfällung unterworfen, zuerst bis 30% Sättigung, danach bis 75% Sättigung. Diese zweite Fraktion wurde nach Dialyse gegen Synthetasepuffer auf eine Aminohexyl-Sepharose 4B Säule ($1\text{ cm} \times 7\text{ cm}$ Fluß 10 ml/h), die mit Synthetasepuffer equilibriert worden war, aufgetragen, und die Synthetaseaktivität durch einen $10-200\text{ mM}$ NaCl -Gradienten wieder abgelöst.

5.2.9. Herstellung von Extrakten zur in vitro Verpackung von Phagen-DNA

Die Präparation hält sich im wesentlichen an die Vorschrift von Scalenghe (et al. 1978) und Hohn, Murray (1977).

5.2.9.1. Das "Freeze-Thaw" Lysat

Drei *E. coli* Kulturen vom Stamm BHB 2688 wurden in 500 ml YT-Medium (s. S. 27) bei 30°C in 2 l Erlenmeyerkolben angezüchtet. Bei einer optischen Dichte von 0,3 A_{600} wurden die Phagen durch 15 minütiges Incubieren bei 45°C in einem Wasserbad ohne Schütteln induziert. Anschließend wurden die Kulturen erneut eine Stunde bei 37°C incubiert.

Geerntet wurde durch 10 minütige Zentrifugation bei 9 000 Upm in einem GSA-Rotor. Die Zellen wurden in 6 ml kalter Succrose-(10%), Tris-(pH 7,5, 50 mM)-Lösung suspendiert, 75 μ l frisch zubereitete Lysozym-Lösung (2 mg/ml in 0,25 M Tris pH 7,5) zugesetzt und gut gemischt. Die Suspension wurde in flüssigem N_2 eingefroren und bei -80°C gelagert. Nach dem Auftauen wurden in Eis 75 μ l M_1 -Puffer (s.S. 26) zugesetzt. Anschließend wurde 35 min zentrifugiert (35 000 Upm, TST 41), der Überstand portioniert und in flüssigem N_2 eingefroren.

5.2.9.2. Der "Sonicated Extract"

Eine *E. coli* Kultur vom Stamm BHB 2690 wurde in 500 ml YT-Medium bei 30°C bis zu einer optischen Dichte von 0,3 A_{600} angezogen, induziert und anschließend geerntet (s.o.). Danach wurden die Zellen in 4,6 ml Puffer-A suspendiert. Die Zellsuspension wurde nun so lange mit Ultraschall behandelt (sonifier), bis die Viskosität der Lösung, die anfangs stark ansteigt, wieder abnimmt. Dabei ist darauf zu achten, daß keine Schaumbildung auftritt, und sich die Lösung nicht zu stark erwärmt. Daher sind die einzelnen Beschallungsintervalle auf etwa 3 sec zu beschränken. Zellen und Zellreste werden abzentrifugiert (8000 g). Der Überstand wird portioniert und schockgefroren.

5.2.9.3. Die Verpackungsreaktion und die Infektion

Ein typischer Ansatz zur Verpackung enthielt:

Puffer A	7 ul
DNA	1-2 ul
M 1-Puffer	1 ul
"sonicated extract"	10 ul
"freeze-thaw"-Lysat	10 ul

Incubation 60 min bei 25°C.

Danach können die Phagen mit entsprechenden Wirtszellen versetzt und ausplattiert werden. Dazu wurden die in 500 ul YT(mal)-Medium verdünnten Phagen mit 100 ul "plating cells" (s. 5.1.2.1.) 15 min bei 37°C incubiert, mit 2,5 ml YT(mal)-Agar (0,7 %) versetzt und ausplattiert auf 1.2 % YT-Agar.

5.2.10. Isolierung von EF-Tu aus E. coli MRE 600

Der EF-Tu Faktor wurde nach der Methode von Lebermann et al. (1980) dargestellt. Die Bakterien wurden bei einer optischen Dichte von 0,5 geerntet, mit Lysozym aufgeschlossen. Die Zellreste wurden abzentrifugiert (9000 x g). Der Überstand wurde über eine CL-6B-Sepharose-Säule und eine AC-A44-Säule aufgetrennt, und die Fraktionen des Eluats auf EF-Tu-Aktivität getestet. Der Bindungstestansatz lautete:

Tris/HCl pH /7,6	50 mM
MgCl ₂	10 mM
NH ₄ Cl	150 mM
DTT	2,5 mM
³ H-GDP	20 uM
Fraktions-Aliquot	30 ul

Gesamtvolumen 40 ul. Die Testansätze wurden 10 min bei 37°C incubiert, mit 1 ml einer eiskalten Waschlösung (Tris/HCl pH 7,6 10 mM, MgCl₂ 10 mM) gestoppt und über NC-Filter auf einer Milliporabsauganlage abgesaugt. Die Filter wurden mit 1 ml Waschlösung nachgereinigt, 20 min bei 60°C getrocknet, mit Toluolszintillator (4 ml) versetzt und in einem Scintillationszählgerät gezählt. Die EF-Tu enthaltenden Fraktionen wurden mit Ammoniumsulfat (NH₄)₂SO₄ (85 % Sättigung) gefällt, im Koppelungspuffer (s.S. 24) gelöst und dagegen dialysiert.

5.2.10.1. Koppelung von EF-Tu an CN-Br aktivierte Sepharose

Das Koppelungsverfahren, das von Cuatrecasas et al. (1968) entwickelt wurde, war von Fischer et al. (1982) modifiziert worden. Die erforderliche Gelmenge wurde in 1 mM HCl ca. 1 Stunde gequollen, über eine G3-Glasfritte (mit GFA-Filter) abgesaugt, mit 1 mM HCl und danach mit 10 ml Koppelungspuffer/g trockenes Gel vorgewaschen. Die Gelsuspension wurde in ein Plastikzentrifugenröhrchen überführt und mit der entsprechenden Menge EF-Tu in Koppelungspuffer (s.S. 24) versetzt (Volumenverhältnis Gel : Puffer 1:2). Etwa 20 mg (ca. 400 nmol EF-Tu) wurden für ca. 5 ml Gel (Endvolumen) verwendet. Durch beständiges Stürzen des gut verschlossenen Röhrchens ("End-over-end"-Mischen) wurde für ein gutes Durchmischen während der Immobilisierungsreaktion (2 Stunden bei Raumtemperatur) gesorgt. Danach wurde das Gel schonend zentrifugiert (10 min 2000 Upm in SS-34-Rotor), der Koppelungspuffer abgezogen und durch die gleiche Menge Blockierungspuffer (s.S. 24) ersetzt. Die Blockierungsreaktion war nach 2-3 Stunden unter beständigem Mischen abgeschlossen. Die Säule (0,8 x 10 cm) wurde mit der auch später verwendeten Flußrate von 6 ml/h gefüllt, dreimal alternierend mit je 10 ml Waschpuffer basisch und sauer gewaschen und für die spätere Nutzung mit TK I equilibriert. Eine so erstellte Säule ist etwa 6 Monate ohne größere Aktivitätsverluste einsetzbar.

5.2.11. Präparationen von Plasmid- und RF-DNA

Die folgenden Präparationen erfolgten nach Vorschriften von Clewell (1972), Clewell-Helinski (1969) und einem Protokoll von Söll (1981).

5.2.11.1. Präparation großer Mengen

Eine 5 ml Kultur (YT-Medium), die ein dem jeweiligen Bakterienstamm und seinem Plasmid entsprechendes Antibiotikum enthielt, wurde über Nacht bei 37°C incubiert, am nächsten Tag 1:10 mit M9-Medium verdünnt und weiter incubiert. Nach etwa 2 Stunden lag eine optische Dichte von etwa 0,8 vor. Nun wurde Chloramphenicol zugesetzt (ethanolische Lösung, Endkonzentration 250 µg/ml), und die Incubation weitere 12-24 Stunden fortgesetzt. Danach wurden die Zellen bei 5000 Upm 5 min lang bei 4°C in einem GSA-Rotor abzentrifugiert. Bei der Präparation von RF-DNA war das zweimalige Waschen

des Zellpellets in low TE (s.S. 25) nötig. Anschließend wurden die Zellen (für eine 250 ml Kultur) in 3 ml 25 % Succrose 50 mM Tris/HCl pH 8 suspendiert, mit 0,6 ml frischer Lysozymlösung (10 mg/ml) versetzt und unter Schütteln 10-15 min auf Eis incubiert. Danach wurden 0,6 ml einer 0,5 M EDTA-Lösung dazu gemischt und erneut 5 min auf Eis belassen. Schließlich wurden 4,8 ml einer Brij-Lösung (1 % Brij-58, 0,4 % Natriumdeoxycholat, 62,5 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl pH 8) langsam unter heftigem Schütteln, zugetropft und nochmals 15 min auf Eis incubiert. Nach dem Zellaufschluß wurde ein S-100 präpariert (90 min 4°C). Der Überstand wurde mit 8 g CsCl und 0,5 ml Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) versetzt. Die trübe Lösung wurde nochmals 10 min 10 000 Upm (SS-34) zentrifugiert und der Überstand durch ein grobes Filterpapier filtriert. Es schloß sich eine CsCl-Gradientenzentrifugation (24-48 Stunden in Festwinkelrotor TFI 65.13, 42 000 Upm, 20°C) an. Nach der Zentrifugation waren in dem Zentrifugenröhrchen eine oder mehrere rötliche Banden zu sehen, deren unterste mit einer Spritze mit Kanüle angestochen und abgezogen wurde. Die abgezogene CsCl-Lösung wurde mit wässriger CsCl-Lösung ($\rho = 1,5$; das ist 53 g CsCl/47 g Wasser) versetzt und einer erneuten Gradientenzentrifugation unterworfen. Die Plasmidbande wurde erneut abgezogen, das Ethidiumbromid durch dreimaliges Ausschütteln mit CsCl-gesättigtem Isopropanol entfernt und dreimal gegen je 2 l low TE dialysiert.

5.2.11.2. Präparation kleiner Mengen ("Mini-plasmid"-Präparation)

Diese Präparation wurde analog der obigen mit verkleinertem Volumen (5 ml Kultur) durchgeführt. Nach dem Zellaufschluß wurde 15 min in einer Tischzentrifuge zentrifugiert, und der Überstand zweimal mit "Phenol" und zweimal mit "Chloroform" extrahiert. 1/10 des Volumens an 3 M Natriumacetat pH 7,0 wurde zugegeben, mit dem zweifachen Volumen an Ethanol bei Raumtemperatur versetzt und 5 min in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 μ l 0,3 M NaOAc (pH 7,0) gelöst, erneut gefällt und schließlich in 19 μ l low TE und 1 μ l DNase-freier RNase (2 mg/ml) gelöst.

5.2.12. Präparation von Phagen DNA

Im wesentlichen wurde die DNA nach dem Protokoll von Blattner (et al. 1977) und Maniatis (et al. 1978) präpariert. Plating cells wurden im

Verhältnis 100:5 bis 1 000 : 5 (multiplicity of infection (moi): 0,05 - 0,005) mit Phagenlysat versetzt. Für eine 250 ml YT (mal)-Kultur wurden 5×10^9 Zellen eingesetzt. Nach Incubation über Nacht bei 37°C trat Lysis ein. Die Kultur wurde mit 5 ml Chloroform versetzt und weitere 30 min bei 37°C incubiert. Danach wurde mit RNase und DNase (ca. 1 mg/l) versetzt, 30 min bei 37°C incubiert und die Suspension auf 1 M NaCl eingestellt. Nach Zentrifugation (s.o.) wurden die Phagen mit PEG 8000 (10 % w/v) eine Stunde in Eis gestellt und abzentrifugiert (10 min, 10 000 Upm, GSA-Rotor, 4°C). Das Pellet wurde in SM (3 ml) gelöst, mit dem gleichen Volumen an Chloroform versetzt und das PEG extrahiert. Die wässrige Phase (ca. 3 ml) wurde mit 1,5 g CsCl versetzt und auf einen CsCl Stufengradienten ($\rho=1,45$, $\rho=1,50$ und $\rho=1,70$ je etwa 1,5 ml) aufgetragen. Nach zwei bis drei Stunden Zentrifugation in einem Ausschwingrotor (TST 41 bei 42 000 Upm) wurde die bläuliche Phagenbande abgezogen, mit CsCl-SM ($\rho=1,5$) aufgefüllt und einer erneuten Dichtegradientenzentrifugation unterworfen. Die Phagenbande wurde dreimal gegen je 2 l Tris-HCl pH 8 (50 mM) NaCl (10 mM) MgCl_2 (10 mM) dialysiert. Danach wurde Na_2EDTA (pH 8,0, Endkonzentration 20 mM) Proteinase K (50 μg pro ml) und SDS (0,5 %) zugegeben und eine Stunde bei 37°C incubiert. Abschließend wurde zweimal mit "Phenol" und zweimal mit "Chloroform" extrahiert und dreimal je 2 Stunden gegen je 2 l low TE dialysiert.

5.2.12.1. "Minilysat"

Präparationen in kleinerem Maßstab (10 ml Kultur) wurden analog durchgeführt. Jedoch wurde das PEG/Phagen-Pellet in 0,5 ml SM aufgenommen, 4 min in einer Tischzentrifuge zentrifugiert, und der Überstand nach der Chloroform-Extraktion mit je 5 μl einer SDS-Lösung (10 %) und EDTA (0,5 M) versetzt und 15 min bei 68°C incubiert. Nach der "Phenolisierung" (5.2.11.2.) wurde mit dem gleichen Volumen an Isopropanol gefällt. Die DNA wurde in 100 μl low TE aufgenommen, mit 50 μl Ammoniumacetat (7,5 M pH 7,5) und 300 μl Ethanol versetzt, erneut gefällt und in 50 μl low TE aufgenommen.

5.2.13. Präparation von "single-strand" DNA aus M 13-Phagen

Eine 10 ml Kultur wurde mit dem E. coli-Stamm JM 103 angeimpft und mit M13 Phagen infiziert (5.2.11.1.). Nach der Zellernte wurde der Überstand (8 ml) mit 2,56 ml einer Polyethylenglykollösung (20 PEG 8000, 2,5 M NaCl) versetzt und 25 min stehengelassen. Das Phagen-Pellet wurde abzentrifugiert in 200 μ l TES-Puffer gelöst, "phenolisiert" (5.2.11.2.), ethanolgefällt und in 10 μ l low TE gelöst.

5.2.14. Isolation von DNA-Fragmenten aus Plasmid und Phagen-DNA

Das Gewicht eines DNA-Fragments läßt sich aufgrund seiner Länge (das Molgewicht eines Basenpaares ist 660 dal) berechnen. Entsprechend der gewünschten Menge an Fragment wurde Plasmid- bzw. Phagen-DNA mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen (siehe Material) im dazugehörigen Puffer verdaut. Das Ansatzvolumen war in der Regel 10 bis 50 μ l. Als grobe Regel gilt, daß pro μ g DNA etwa 0,5 bis 1 Einheit (laut Definition des Herstellers) eingesetzt wurde. Nach 2 bis 3 Stunden Incubation wurde der Verdauansatz entweder gleich oder nach einer Ethanolfällung (5.2.12.1.) auf einem Gel nach Fragmentgröße aufgetrennt. Hierzu wurden entweder Agarosegele oder PAA-Gele gewählt.

5.2.14.1. Trennung auf Agarosegel

Die Konzentrationen für Agarose im Gel liegen zwischen 0,5 % (Bruchstücke > 1500 bp) und 1,5 % (< 200 bp). Agarose wird abgewogen, mit der entsprechenden Menge E-Puffer (s.S. 25) versetzt und aufgeköcht, danach mit Ethidiumbromidlösung (Endkonzentration 50 μ g/100 ml Gel) versetzt und in eine horizontale Gelschale gegossen, in der ein Kamm für Lücken zum Auftragen der Proben (slots) sorgt. Die Elektrophorese wird bei konstantem Stromfluß (25 bis 50 mA) in E-Puffer durchgeführt. Die Stellen, an denen DNA bandiert, sind unter UV sichtbar. Vor dem Auftragen wird die Probenlösung mit 1/10 des Volumens an Auftragspuffer versetzt.

5.2.14.2. Trennung auf PAA-Gelen (siehe auch 5.2.5.)

Nicht denaturierende (ohne Harnstoff) Gele, die 5-10 %ig an einer Lösung waren, die Acrylamid und Bisacrylamid im Verhältnis 30 : 1 enthielt wurden zur Trennung von DNA-Fragmenten verwendet. Vertikale Gele wurden unter 0,5-fachem TBE-Puffer elektrophoretisiert. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 1/10 des Volumens an "sample buffer" versetzt. Die Elektrophorese wurde bei 12 mA durchgeführt.

5.2.14.3. Elektroelution von DNA aus Gelen

5.2.14.3.1. Elektroelution aus Agarosegelen

Die gewünschten DNA-Banden wurden ausgeschnitten und in einen Dialyseschlauch gesteckt. Der Dialyseschlauch wurde verschlossen, nachdem er mit möglichst wenig E-Puffer luftblasenfrei gefüllt worden war. Der Schlauch wurde nun in das in ein 1,5 %iges Agarosegel (ohne Ethidiumbromid) geschnittene Fenster gelegt. Die Elution wurde in E-Puffer 30 min lang bei 200 mA durchgeführt, gegen Ende der Elution wurde der Strom für 15 sec umgepolt. Die wässrige DNA-haltige Lösung aus dem Schlauch wurde "phenolisiert" (5.2.12.2.) und ethanolgefällt.

5.2.14.3.2. Die Elution aus PAA-Gelen

DNA-Fragmente wurden aus PAA-Gelen eluiert. Die Gelstückchen wurden in Pipettenspitzen überführt, über die ein auf einer Seite verschlossener Dialyseschlauch gestülpt war. Der offene Teil der Pipettenspitze lag im Pufferraum der Kathode, der Dialyseschlauch im Anodenraum. Die Elution dauerte bei 2 mA je nach DNA-Länge 2 - 6 Stunden. Als Puffer wurde immer der verwendet, der während der Elektrophorese angewendet wurde. Der Puffer im Dialysesack enthielt die DNA, die durch "Phenolisierung" (5.2.11.2.) und Ethanolfällung (5.2.12.2.) wiedergewonnen wurde.

5.2.15. Isolierung von Keimzellkernen von *Xenopus laevis*

Unreife Eizellen des Krallenfrosches *X.laevis* wurden durch einen operativen Eingriff gewonnen, wie bei Söll (1981) beschrieben. Der weibliche Frosch wurde bei 20-25°C in einem Wasserbecken gehalten und einmal wöchentlich mit Schweineleber (ca. 10 g) gefüttert. Die Anästhesie wurde durch Abkühlen des Tieres in einem Eisbad gesichert. Dem auf dem Rücken auf Eis liegenden Tier wurde mit einem Skalpell die linke bzw. rechte Seite des Unterbauchs etwa 1 cm lang geöffnet. Mit einer Pinzette wurden Teile der Ovarien entnommen und in eiskalten "priming buffer" gelegt. Sowohl die muskulöse Bauchdecke als auch die ledrige Haut wurden mit catgut-Fäden (je 2 Nähte) vernäht. Die Eier wurden mit einem gebogenen Glasstab aus den Ovarien gestrichen.

5.2.15.1. Isolierung der Kerne der Eizellen

Die Eier wurden in J-Puffer (s.S. 26) überführt. Unter einem Binokular wurden die Oocyten dann auf der hellen Seite mit einer feinen Pinzette fixiert. Mit einer Nadel wurde die dunkle Seite angestochen, worauf der Kern (germal vesicles, GVs) herausquoll. Mit einer Pipette wurde der Kern zusammen mit etwas Puffer (< 1 ul) angesaugt und in ein Röhrchen in Eis überführt. Je 10 GVs wurden schockgefroren und pro Transkriptionsansatz verwendet.

5.3.1. Reinigung von Alkalischer Phosphatase

Kommerzielle Präparationen von alkalischer Phosphatase aus Kälbermägen (CAP) haben leicht Verunreinigungen von Exonucleasen und werden daher nach einem Verfahren von Estradiadis et al. (1977) gereinigt. 1-2 mg des Enzyms wurden auf eine G 75-Säule (7,5 x 35 cm, Fluß 4 ml/h, 4°C), die mit Tris-HCl (pH 8,4 20 mM) und HCl (100 mM) equilibriert war, aufgetragen. Die Fraktionen (150 ul) wurden auf Aktivität getestet. Suchtestansatz:

Tris pH 9, 1 M,	50 ul
p-Nitrophenylphosphat (74mg/2ml),	100 ul
Magnesiumchlorid 1 M,	20 ul

Die Extinktion wurde bei Raumtemperatur bei 420 nm verfolgt.

5.3.2. Aminoacylierung von tRNA

Die Aminoacylierung wurde in Eppendorf-Incubationsgefäßen in einem Volumen von 35 µl oder einem Vielfachen davon wie in 5.2.6.2. beschrieben durchgeführt. Incubation unter N_2 bzw. O_2 wurden durch Einleiten der Gase durch eine Glaskapillare durchgeführt. Der Gasdruck wurde so reguliert, daß ein Schäumen der Lösung gerade vermieden wurde.

5.3.3. Verdau von DNA mit Restriktionsendonucleasen

Die Verdaubedingungen, die von den Herstellern der Enzyme angegeben werden, wurden beibehalten (siehe auch Material und 5.2.14.).

5.3.4. Ligation von DNA-Fragmenten

Die Incubationsbedingungen sind für die einzelnen Chargen von T_4 -DNA-Ligase vom Hersteller angegeben, jedoch wurde immer über Nacht bei $10^{\circ}C$ incubiert. Die Theorie zur Berechnung der Mengenverhältnisse der DNA-Fragmente und -Vektoren ist im Laborhandbuch von Cold Spring Harbor (1982) genau beschrieben. Die Menge an eingesetzter Vektor-DNA lag zwischen 0,5 und 3 µg. Ligiert man kohäsive Enden von DNA, so enthält ein 10-20 µl Ansatz etwa 1-4 pmol an DNA-Fragment mit einem äquimolaren Verhältnis an Vektor. Es wurden 0,5 µl Ligase (das entspricht 0,1 Einheiten) eingesetzt. Die Ligation stumpfer Enden ist durch hohe Konzentrationen an DNA und Ligase gefördert (Sugino et al. 1977). Bei kleinerem Ansatzvolumen (8-10 µl) wurde daher etwa die gleiche DNA-Menge mittels der bis zu vierfachen Menge an Enzym ligiert. Zum Anfügen von Linker-Fragmenten an "stumpfe" DNA-Enden wurden die Linker-Fragmente in 15-20 fachem molaren Überschuß eingesetzt. Bei λ -Phagen-DNA ist darauf zu achten, daß vor Zugabe des Enzyms zum Ligationsansatz die Lösung der DNA im Ligationspuffer eine Stunde lang auf $42^{\circ}C$ zu erwärmen ist (wegen der Religierung der cos-sites), bevor sie auf Incubationstemperatur ($10^{\circ}C$) abgekühlt wird.

5.3.5. Ligation von ^{32}pCp an tRNA^{Val}

Ein typischer Ansatz für die 3'-Markierung von kleinen tRNA-Mengen (10-50 ng) sah wie folgt aus:

tRNA/H ₂ O	3,5 ul
0,5 M Hepes-KOH pH 7,5	
0,15 M MgCl ₂	1,0 ul
100 mM DTT	0,3 ul
DMSO	1,0 ul
0,4 M ATP	1,0 ul
T ₄ -RNA Ligase	2,0 ul
^{32}pCp	1,2 ul

Incubation in Eis im Kühlschrank über Nacht.

Die Trennung der markierten tRNA vom Reaktionsgemisch erfolgte durch Elektrophorese des Ansatzes auf einem denaturierenden (50 % Harnstoff) 8 %igen (20:1) Polyacrylamidgel 2 Stunden bei 36 mA in 1 x TBE. Die tRNA-Bande wurde durch Autoradiographie (Expositionszeit 10-20 min) detektiert.

5.3.6. Markierung von tRNA ^{125}I

Die Iodierung von tRNA wurde nach einer modifizierten Vorschrift von Tereba, McCarthy (1973) durchgeführt. Die Stammlösung enthielt:

0,41 mM KI	5,0 ul
5 mM ICl ₃	4,8 ul
0,5 M NaOAc pH 5,0	3,0 ul
H ₂ O	<u>14,2 ul</u>
	27,0 ul

Die entsprechende tRNA-Menge (0,5-2 ug) wurde lyophilisiert, in 9 ul des Stammlösungsansatzes gelöst und mit 1 ul (= 1 uCi s.S. 21) der ^{125}I -Lösung (KI) gemischt. Die Incubation erfolgte 15 min bei 70 °C. Danach wurde der Ansatz in Eis mit 70 ul Phosphatpuffer (0,5 M pH 6,8, 10 mM an GME) versetzt und zur Zerstörung von instabilen Zwischenprodukten 45 min auf 60 °C erhitzt. Die Trennung der markierten tRNA vom Reaktionsgemisch ist in 5.3.5. beschrieben.

5.3.7. Markierung von DNA

Prinzipiell bieten sich dazu drei Methoden an.

Die erste ist die sogenannte "nick-translation" oder auch "nick"-Reparatur durch DNA-Polymerase I. Dieses Enzym hat eine 3'-5' und eine 5'-3' Exonuclease-Aktivität und eine 5'-3' Synthetase-Aktivität. Setzt man nun auf der zu markierenden DNA (z.B. Plasmid) statistisch verteilt mittels DNase I Einzelstrangbrüche ("nicks"), so wird jeweils von dort aus ein Strang wegverdaut und neu synthetisiert. Das führt zu einer relativ hohen spezifischen Aktivität, allerdings statistisch verteilt über das ganze Plasmid.

Die zweite ist die sogenannte "fill-in"-Synthese durch das große Fragment der DNA-Polymerase, dem Klenow-Enzym. Diesem Enzym fehlt die 5'-3'-Exonuclease-Aktivität des Holoenzym. Dadurch werden DNA-Fragmente an den 5'-überhängenden Enden, die durch viele REN erzeugt werden, markiert, was zu "stumpfen" Enden führt. Die spezifische Aktivität ist hier nicht so hoch, da nur die Enden markiert sind.

Die dritte ist eine Austauschsynthese ("replacement-synthesis", auch T_4 -Markierung oder " T_4 -labeling" genannt) durch T_4 -DNA-Polymerase. Dieses Enzym besitzt eine 3'-5' Exonuclease-Aktivität und eine 5'-3' Synthetase-Aktivität. Nach Verdau mit einer beliebigen REN wird von dieser einen Schnittstelle ausgehend der Strang in Abwesenheit von Deoxytriphosphaten abverdaut. Gibt man nun die entsprechenden radioaktiven und nicht markierten Nukleosidtriphosphate zu, so wird er entsprechend der Matrix wieder synthetisiert. Das führt zu einer sehr hohen und sehr exakt lokalisierten spezifischen Aktivität. Das markierte Fragment läßt sich durch Verdau mit einer zweiten REN freisetzen.

5.3.7.1. "Nick-repair"

Etwa 1-2 μ g DNA wurden in einem Ansatz (25 μ l), der 60 mM an Tris/HCl (pH 7,5) und 20 mM an $MgCl_2$ war, mit 1,5 μ l einer verdünnten DNase I-Lösung (s.u.)verdaut. Schon während des Verdaus waren die Triphosphate in einer Endkonzentration von 0,2 mM sowie 30-100 uCi des radioaktiv markierten Triphosphats vorhanden. Nach genau einer Minute bei Raumtemperatur wurden 5 μ l der DNA-Polymerase I-Suspension zugegeben. Nach mindestens 2 Stunden bei 14,5°C erfolgte die Isolation über eine Mini-Säule (5 ml), die mit

Sephadex G 50-medium gefüllt war. Fraktionen (5 Tropfen), die durch Elution der Säule mit TEN-Puffer erhalten wurden, wurden durch Entnahme eines Aliquots (5 μ l) entsprechend ihrer Aktivität gepoolt.

(Die DNase I lag in einer Konzentration von 1mg/ml in einer Lösung aus Tris/HCl (pH 7,5, 10mM), Ca^{2+} (10 mM) und Mn^{2+} oder Mg^{2+} (10 mM) vor und wurde mit einer Lösung aus Tris/HCl (pH 7,5, 10mM), Mn^{2+} (1 mM) (oder Mg^{2+} , 5mM) und BSA (1 mg/ml) im Verhältnis 1:10 verdünnt. Vor der Verwendung wurde sie nochmals 1:1000 mit einer Tris/HCl-Lösung verdünnt.)

5.3.7.2. Ansatz zur Erzeugung "stumpfer" DNA-Enden ("fill-in" Synthese)

Einige REN erzeugen 5' überhängende (protruding) Enden, die in vitro mit den entsprechenden Nukleotiden und Klenow-Enzym zu "stumpfen" Enden (blunt ends) aufgefüllt werden können. Ein typischer Ansatz lautete:

Lösung der verdauten DNA/ H_2O	24,3 μ l
N_2 -Puffer	3,0 μ l
100 mM DTT	0,3 μ l
dNTP (je 0,5 mM)	2,0 μ l
Großes Fragment der DNA-Polymerase = Klenow Enzym	0,4 μ l

Verwendet man ein radioaktiv markiertes Nucleotid, so ist nach 15 min eine weitere Incubation mit dem entsprechenden "kalten" Nucleotid für 15 min anzuschließen.

Der Ansatz (30 μ l) wurde 15 min bei Raumtemperatur incubiert. Danach wurde das Enzym durch 10 minütiges Erhitzen auf 65°C zerstört und der Ansatz durch "Phenolisierung" (5.2.11.2.) deproteiniert.

5.3.7.3. T_4 -Markierung

0,5-10 μ g DNA wurden mit einer REN in einem Volumen von 10 μ l verdaut. Danach wurde 1 μ l T_4 -Pol-Puffer, 0,5 μ l einer 10mM DTT-Lösung und 1 μ l der T_4 -DNA-Polymerase zugegeben. Nach 5 Minuten bei 37°C wurden der Lösung 200 uCi dCTP und 1 μ l eines Gemischs der drei anderen Nucleotidtriphosphate (je 1,5 mM) zugegeben. Nach weiteren 5 Minuten bei 37°C wurde 1 μ l einer 1,5 mM dCTP-Lösung zugegeben und nochmals 5 Minuten bei 37°C incubiert. Vor dem Verdau mit einer zweiten REN wurde die T_4 -DNA-Polymerase durch Erhitzen

denaturiert (10 min, 65°).

5.3.8. Bindungstest von aminoacylierter tRNA an EF-Tu

Incubiert man EF-Tu (10 ng ~ 200 pmol) mit aminoacylierter tRNA (0,1, A₂₆₀ = 180 pmol) in Gegenwart von ³H-GTP (100 mM, spezifische Aktivität 100 mCi/mmol), so bildet sich ein ternärer Komplex EF-Tu-aatRNA^{aa}-GTP, der beim Filtrieren der gestoppten Incubationslösung (vgl. GDP-Bindungstest 5.2.10.) das NC-Filter passiert, während der binäre Komplex, EF-Tu-GTP, festgehalten wird. Die Durchführung und die Zusammensetzung des Incubationsansatzes war analog 5.2.10.. Die Auswertung erfolgte nach der in 5.2.3 angegebenen Formel.

5.3.9. Periodat-shift

Der Periodat-shift von Q-haltigen tRNA-Isoacceptoren und die darauf folgende RPC-5 Analyse wurden wie von Pistel (1982) beschrieben, durchgeführt.

5.3.10. In vitro Transkription

In vitro Transkriptionsexperimente wurden in zwei verschiedenen eukaryotischen Systemen durchgeführt: In Extrakten von *X.laevis* Keimzellvesikeln (GV) (Schmidt et al. 1978) und in Hela-Zellextrakten (Weil et al. 1979). Als Substrat für RNA-Polymerase III wurde jeweils 0,5 ug Plasmid-DNA eingesetzt. Transkriptionsansätze in GV-Extrakten enthielten in 20 ul Endvolumen ATP, CTP, UTP (je 0,5 mM), GTP (0,05 mM), α -³²P-GTP (3 uCi, 635 Ci/mM), DTT (0,5 mM), KCl (70 mM), Hepes/KOH pH 7,4 (10 mM) und dem Extrakt von je 10 Oocytenkernen in 5 ul J-Puffer.

Transkriptionsansätze in Hela enthielten in 40 ul Endvolumen ATP,CTP UTP (0,5 mM) GTP (0,05 mM), α -³²P-GTP (5 uCi), DTT (0,5 mM), Hepes/KOH pH 8,0 (30 mM), KCl (100 mM), MgCl₂ (5 mM) und je 20 ul Hela-Extrakt.

Nach einer Stunde Incubation bei 37°C wurden die Reaktionen durch 15 min Verdau mit je 30 ug Proteinase K gestoppt, "Phenol"-extrahiert und ethanol-gefällt. Die Transkriptionsprodukte wurden durch Polyacrylamidgel-Elektrophorese (8 % PAA 19 + 1), 50 % Harnstoff, 1 x TBE-getrennt. Sollte die Kompetitionsfähigkeit einzelner Plasmide getestet werden, so wurden dieses in steigender Konzentration zu Hela-Zellextrakten zugegeben (0,0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,5, 0,7, 0,9 ug). Mit pBR 322 DNA wurden in jedem Ansatz eine DNA-Konzentration von 1,2 ug eingestellt. Durch Zugabe von Zellextrakt wurden die Reaktionen gestartet. Nach 15 min wurden je 0,3 ug einer gut transkribierbaren Plasmid-DNA (in unserem Fall ein tRNA^{Arg}-Gen von *Drosophila melanogaster*: pArg; Silverman et al. 1979) zugegeben und für weitere 60 min incubiert. Nach gelelektrophoretischer Trennung und Autoradiographie wurden die pArg-Transkriptionsprodukte durch Cerenkov-Zählung quantifiziert.

5.3.11. In vitro Translation

Ein System zum Studium der Proteinbiosynthese von *Dictyostelium discoideum* im Reagenzglas wurde nach einer Arbeit von Hames et al. 1977 etabliert. Polysomen von *Dictyostelium discoideum* wurden zusammen mit einem S-30 Enzymextrakt und Gesamt-tRNA des Schleimpilzes incubiert. Ein typischer Ansatz enthält 50 ul:

¹⁴ C-ASN	5 uM
19 andere Aminosäuren je	25 uM
Spermidin	1 mM
Putrescin	8 mM
DTT	2 mM
ATP	1 mM
GTP	20 uM
Creatinphosphat	8 mM
Creatinphosphatkinase	2 ug/Ansatz
Hepes pH 7,0	20 mM
MgCl ₂	1-20 mM
KCl bzw. Na ₄ Cl	40 mM
S-30	30-100 ug/Ansatz
tRNA	2-10 A ₂₆₀ /Ansatz
Polysomen	2-10 A ₂₆₀ /Ansatz

(Die Konzentrationen an Spermidin und Putrescin entsprachen in etwa den in Dictyostelium discoideum-Zellen vorliegenden Konzentrationen). Creatinphosphat und Creatinphosphatkinase dienten als Energieregenerierungssystem).

Die Incubation erfolgte bei 22°C (Wasserbad) über eine Stunde. Den entnommenen Aliquots (10 µl) wurde je 1 Tropfen einer 1 %igen wässrigen Albuminlösung zugesetzt, und anschließend wurde das Protein mit 2 ml 5 %ige TCA bei 0°C gefällt. Um mitgefällte aminoacylierte tRNA zu hydrolysieren, wurde die Lösung 15 min auf 90°C erhitzt. Danach wurden die Proben über GFA-Filter abgesaugt und je dreimal mit je 3 ml 5 %ige TCA, Ethanol und Äther gewaschen. Nach dem Trocknen (15 min, 60°C) wurden die Filter in Toluolszintillator gezählt (vgl. 5.2.3.).

5.3.12. Transformationsansätze

Ein typischer Transformationsansatz enthielt bis zu 10 µl einer DNA-Lösung und wurde mit 100 µl Transformationspuffer und 200 µl kompetenten Zellen versetzt. Danach wurde er 30 min bei 0°C, 4 min bei 37°C, 10 min bei Raumtemperatur incubiert, bevor 1 ml YT-Medium (eventuell mit den nötigen Antibiotika) zugegeben wurde. Diese Lösung wurde 30 min bei 37°C belassen, dann wurde 2,5 ml 0,7 %iger YT-Agar (42 °C) zugegeben, der, wenn der Stamm JM 103 verwendet wurde, noch zusätzlich 10 µl einer IPTG-Lösung (2,3 mg/ml) und X-Gal (1mg/50µl DMF) enthielt. Diese Ansätze wurden auf Agarplatten ausplattiert.

5.3.12.1. Herstellung kompetenter Zellen

Bakterien wurden nach der CaCl_2 -Methode von Mandel, Higa (1970) und Cohen et al (1972) kompetent zur Aufnahme von DNA gemacht. 1 ml stationäre Zellen wurden auf 100 ml (YT-Medien) verdünnt. Nach 1 1/2 - 3 Stunden Incubation bei 37°C wurde bei einer Zelldichte von 5×10^8 Zellen/ml (0,5 A_{600}) durch Zentrifugation geerntet. Die Zellen wurden in 40 ml 50 mM CaCl_2 -Lösung suspendiert und 15 min in Eis belassen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 8 ml 50 mM CaCl_2 (bzw. 50 mM CaCl_2 /10% Glycerin, wenn sie bei - 80°C gelagert werden sollten) aufgenommen.

5.3.12.2. Infektion von Bakterien mit Phagen

5.3.12.2.1. Titration einer Lösung mit unbekannter Phagen-Konzentration

Sechs Röhrchen mit je 0,5 ml YT-Medium (10 mmol an $MgCl_2$) wurden vorbereitet. In das erste wurden 5 μ l der Phagenlösung pipettiert, daraus wurden nach dem Mischen erneut 5 μ l entnommen und in das zweite pipettiert usw. Danach wurden alle Lösungen mit je 100 μ l "plating cells" versetzt und 20 min bei 37 C belassen. Schließlich wurden sie mit je 2,5 ml 0,7 % igen YT-Agar versetzt und ausplattiert (vergl. auch 5.2.9.3.).

5.4. Hybridisationstechniken

5.4.1. DNA-Transfer auf Nitrocellulose-Filter

5.4.1.1. DNA-Fragmente aus Agarosegelen auf NC-Filter (Southern 1975)

Nach der Elektrophorese wurden die photographierten und zugeschnittenen Gele 20 min in eine denaturierende Lösung (0,5 mM NaOH, 1,5 M NaCl) gelegt und danach 20 min in 0,5 M Tris-HCl pH 7,5, 3 M NaCl neutralisiert. Während dieser Zeit wurde eine Plastikwanne (20 x 20 cm) mit einer Glasplatte so abgedeckt, daß 2 Lagen Whatman 3MM Papier, das mit 20 xSSC getränkt war auf beiden Seiten der Glasplatte in die in der Wanne befindliche Lösung (20 xSSC ca. 200 ml) eintauchten. Auf das Papier wurde das Gel gelegt und darauf ein genau zugeschnittener Streifen NC-Filter, oder "genescreen", der an der gleichen Stelle wie das Gel markiert war. Das NC-Filter war mit Wasser benetzt und wurde auch in 20 xSSC getränkt. Der ganze Aufbau wurde mit Frischhaltefolie abgedeckt, in die ein Fenster von der Größe des Gels geschnitten war. In die Öffnung wurden nun ebenfalls zwei zugeschnittene und getränkte Blätter Whatman 1-Filter gelegt und das ganze ca. 5-10 cm hoch mit saugfähigem Papier abgedeckt. Der Papierstapel wurde beschwert. Nach 24 bis 48 Stunden wurde der Versuch abgebaut, das NC-Filter 20 min in 2 xSSC gelegt, luftgetrocknet, und die DNA darauf durch Backen bei 65 C über Nacht fixiert.

5.4.1.2. Transfer von DNA aus Bakterienkolonien auf Filter (colony-hybridisation)

Diese Methode ist bei Söll (1981) beschrieben. Agarplatten mit Bakterienkolonien wurden mit entsprechend zugeschnittenen Whatman 541-Filtern abgedeckt. Die Filter wurden abgehoben, mit der "Bakterienseite" nach oben auf eine cam-Platte transferiert und dort zur Amplifizierung des Plasmids 12-24 Stunden bei 37°C incubiert. Danach wurden die Filter nacheinander in Lösungen getränkt.

1. 0,1 M NaOH 37 °C 30 min.
2. 1 M Tris/HCl pH 7,5, RT, zweimal je 1 min
3. 0,5 M Tris/HCl pH 7,5, 1,5 M NaCl, RT, 1 min.
4. 2 xSSC, RT, 1 min
5. 95 % Ethanol, RT, > 5 min.

Nach dem Lufttrocknen wurde die DNA auf den Filtern 1 Stunde bei 65°C gebacken.

5.4.1.3. Transfer von DNA aus Phagen Plaques auf NC-Filter

Der Transfer folgt einer "screening"-Methode von Benton, Davis (1977). Die zugeschnittenen Filter wurden auf die vorgekühlten Platten mit dem Bakterienrasen und Plaques gelegt und durch Einstechen einer mit Tusche gefüllten Nadel markiert. Nach ca. 1 min wurden sie in folgende Lösungen gelegt.

1. 0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl 1 min
2. 1 M Tris/HCl pH 8,0, 1,5M NaCl, > 5 min
3. 2 xSPE, 1 min.

Danach wurden die Filter luftgetrocknet, und die DNA über Nacht bei 65°C auf den Filtern fixiert. Nach Woo et al. (1978) kann die DNA-Ausbeute erhöht werden, wenn man die Filter vor dem Denaturieren mit der "Phagenseite" nach oben auf einer frischen Agarplatte 12 Stunden lang bei 37°C incubiert.

5.4.2. RNA-Transfer von PAA-Gelen auf "gene-screen" Papier

Nach der Elektrophorese wurde das Gel dreimal je 10 min mit 40 mM Na/K-Phosphat-Puffer pH 6,5 gewaschen. Beim letzten Waschen wurde Ethidiumbromid (0,5 mmg/l) zugesetzt, das Gel auf dem UV-Kasten photographiert und zurechtgeschnitten. Danach wurde das Ethidiumbromid wieder herausgewaschen. Nun wurde das Gel auf eine Lage 3 MM Papier gelegt, das wiederum auf einem Plastikgitter lag. Das Gel wurde mit einem genau zugeschnittenen "gene-screen"-Filter bedeckt und mit einer zweiten Lage Papier und Plastikgitter abgedeckt. Die beiden Gitter wurden in eine Halterung geschraubt und so in ein Becken mit 8 l 40 mM Phosphatpuffer (pH 6,5) gestellt, daß sie senkrecht zum angelegten elektrischen Feld standen. Der "gene-screen"-Filter lag dabei auf der anodischen, das Gel auf der kathodischen Seite. Das eigentliche "elektro-blotting" wurde zwei Stunden lang bei 400 mA im Kühlraum durchgeführt. Danach wurde der Filter luftgetrocknet und gebacken (5.4.1.1.).

5.4.3. Hybridisationsansätze

5.4.3.1. Fixierte DNA oder RNA, DNA als Probe

Die vorbereiteten Filter (s.o.) wurden vorhybridisiert (2 - 24 Stunden bei 42 °C). Dazu wurden die Filter zusammen mit der entsprechenden Menge (ca. 20-50 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ Filter) DNA-Prehybridpuffer in Folie luftblasenfrei eingeschweißt. Dem DNA-Prehybridpuffer waren zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ niedermolekulare DNA-Lösung zugesetzt worden. Diese war durch 20 minütiges Kochen und 10 minütiges Abkühlen in Eis denaturiert worden. Nach der Vorhybridisation wurde obiger Vorgang wiederholt, jedoch wurde diesmal an Stelle der DNA-Lösung die radioaktiv markierte denaturierte Probe zugesetzt. Diese eigentliche Hybridisation wurde 24 - 48 Stunden bei 42°C durchgeführt. Anschließend wurden die Filter in Plastikschaalen mit je 200 ml Puffer gewaschen:

1. 2 xSSC bei Raumtemperatur 3 x 10 min
2. 0,2 xSSC + 0,5 % SDS 65°C, 3 x 30 min
3. 0,1 xSSC bei Raumtemperatur, 3x 30 min.

Nach ca. 10 min Lufttrocknen wurden die Filter zur Autoradiographie aufgelegt.

5.4.3.2. Fixierte DNA, tRNA als Probe

Die Vorhybridisation (s.o.) wurde in RNA-Prehybridpuffer nach einer Methode von Beckmann et al. (1977) durchgeführt, ohne Zusatz von DNA- oder RNA-Lösung. Bei Hybridisationen in RNA-Prehybridpuffer waren die radioaktiv markierten Proben zugesetzt, ohne die tRNA zuvor aus den PAA-Gelen zu eluieren (vgl. 5.3.5. und 5.3.6.). Das Waschen erfolgte mit dem zur Vorhybridisation verwendeten Puffer (zweimal je 30 min bei 42°C) und anschließend mit 2 xSSC (200 ml je dreimal 10 min bei Raumtemperatur).

5.5. Sequenzierung von DNA

Eine Zusammenfassung des heutigen Standes der Sequenzierungstechniken und der ihnen zugrunde liegenden Theorien ist von Deininger (1983) unlängst veröffentlicht worden (siehe auch Smith 1980).

5.5.1. Sequenzierung nach Dideoxy-Methode

Die Dideoxy-Methode stammt von Sanger et al. (1977). Das zu sequenzierende DNA-Fragment liegt im M 13-Phagen als Einzelstrang-DNA vor. Der Stammsatz lautet:

ss-DNA	1,0 ul
Primer-Lösung	0,8 ul
N 2-Puffer	1,2 ul
H ₂ O	<u>9,0 ul</u>
	12,0 ul

Das Reaktionsgemisch wurde 2 min in ein gerade noch siedendes Wasserbad (> 90°C) gestellt danach 10 min bei 65°C, anschließend 10 min bei 37°C und dann 10 min bei Raumtemperatur incubiert. Alle folgenden Arbeiten wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach Zugabe von 1 ul DTT (100 mmol), 1 ul (α ³²P-d-ATP) und 0,5 ul DNA-Polymerase (Klenow-Enzym) wurde der Stammsatz auf die 4 Sequenzierungsansätze verteilt. Die einzelnen Sequenzierungsansätze enthielten:

Ansatz	A		C		G		T	
N _O -Mixe	A _O	1 ul	C _O	1 ul	G _O	1 ul	T _O	1 ul
ddNTP	ddATP	1 ul	ddCTP	1 ul	ddGTP	1 ul	ddTTP	1 ul
	(0,002 mM)		(0,2 mM)		(0,4 mM)		(4 mM)	
Stammansatz	3 ul		3 ul		3 ul		3 ul	

Die Zusammensetzung der N_O-Mixe ist folgender Tabelle zu entnehmen:

	A _O	C _O	G _O	T _O
N ₂	7,5 ul	7,5 ul	7,5 ul	7,5 ul
0,5 mM dCTP	7,5 ul	1,0 ul	10,0 ul	10,0 ul
0,5 mM dGTP	7,5 ul	10,0 ul	1,0 ul	10,0 ul
0,5 mM dTTP	7,5 ul	10,0 ul	10,0 ul	1,0 ul

Die Ansätze wurden 15 min bei Raumtemperatur incubiert, danach 0,6 ul einer dATP-Lösung (1 mM) zugegeben und erneut 15 min bei Raumtemperatur incubiert. Nach Zugabe von je 5 ml "sample-buffer" wurden die Ansätze 5 min auf 90°C erhitzt und in Eis abgeschreckt. Danach wurden 1,5 ul eines jeden Ansatzes aufs Gel mittels ausgezogener kalibrierter Kapillaren aufgetragen. Die verwendeten Gele waren 50 cm lang und 0,2 mm dick. Die hintere Glasplatte war wassergekühlt. Sie war zuvor mit "repel-silane", das direkt aufgetragen wurde und dann mit Ethanol poliert wurde, behandelt worden. Die vordere Glasplatte war mit "bind-silane" behandelt worden (5 ml einer Lösung aus 25 ml Ethanol und 75 ul "bind-silane" und 750 ul 10 % iger Essigsäure wurden auf die Platte aufgetragen und nach dem Trocknen (10 - 15min) mit Ethanol poliert). Für den ersten und z.T.auch für den zweiten Auftrag waren die Gele 8 %ig an PAA (20:1) (vgl. auch 5.2.5.), für den dritten Auftrag 6 %ig; in beiden Fällen enthielten sie 50 % Harnstoff und 1 xTBE-Puffer. Gestartet wurde die Polymerisation der Gele mit 0,03 % (v/v) TMED und 0,075 % (v/v) Ammoniumperoxidisulfat. Wenn der BPB-Farbstoff-Marker des ersten Auftrags aus dem Gel lief, wurde ein zweites Mal aufgetragen. Die Elektrophorese wurde gestoppt, wenn der XCFF-Marker des zweiten Auftrags den Anodenpufferraum erreichte. Danach wurden die Platten getrennt, das Gel mit Frischhaltefolie abgedeckt und autoradiographiert (12 -24 Stunden Exposition). Auf diese Weise sind bis zu 250 Basen einer Sequenz zu lesen. Für "screening" -Tests reicht es auch, nur zwei Spuren (C und G-"lane") aufzutragen und auch die Ansätze entsprechend zu verkleinern.

5.6. Konstruktion von Deletionsklonen durch Bal 31 Verdau

Bal 31 ist eine "prozessive" Exonuklease. 35 µg von M 13 mp 8 RF-DNA, die ein 800 bp Fragment von Dictyostelium discoideum enthielt, wurden mit einer REN (Bam H I) verdaut. Nach Phenolextraktion und Ethanol-fällung wurde die DNA in 23 µl Rinderserumalbumin (500 µg/ml) und 25 µl 2 x BAL-Puffer gelöst. Nach 3 min Vorincubation wurden 2 µl Bal 31 zugegeben. Nach 3, 6, 10, 13, 18, 23, 28, 33 und 38 min wurden je 5 µl entnommen. Die entnommenen Aliquots wurden jeweils mit 5,5 µl EDTA (200 mM pH 8,0) und 100 µl Phenol-Chloroform-gesättigtem TE-Puffer versetzt. Nach zweifacher "Phenolisierung" und Ethanol-fällung wurden die Enden durch "fill-in"-Synthese (vgl. 5.3.7.) in Gegenwart von 32 P-dATP "stumpf" gemacht. Danach wurden die Fragmente mit Hind III verdaut. Diese unterschiedlich langen DNA-Fragmente wurden auf ein PAA-Gel (5 %, 29 + 1) nach Größe fraktioniert und getrennt in Größenklassen elektroeluiert. Diese wurden dann in den Vektor M 13 mp 9 (Hind III, Hinc II verdaut) ligiert. Mit diesen rekombinierten DNAs wurde JM 103 transformiert.

Durch dieses Verfahren wurde das Gen vom Bam H I Ende her verkürzt, wobei zunehmend 3'-flankierende Sequenzen des tRNA-Gens deletiert wurden. Die so erhaltenen Mutanten wurden daher 3'-Deletionsmutanten genannt. 5'-Deletionsmutanten wurden nach dem gleichen Prinzip erhalten, jedoch wurde zuerst mit Hind III und nach der successiven Verkürzung des Gens mit Bal 31 mit Bam H I. Die so erhaltenen Fragmente wurden dann in M 13 mp 8 (Bam H I, Hinc II verdaut) ligiert.

6. E R G E B N I S S E

In *Dictyostelium discoideum* liegt, wie von Dingermann et al. (1981) gezeigt wurde, zu Beginn der Differenzierung, die durch Nahrungsentzug eingeleitet wird, eine tRNA der Q-Familie, nämlich tRNA^{Asn}, unterbeladen vor. Insbesondere ist davon der G- und nicht der Q-haltige Isoacceptor betroffen. Das Verhalten von Q- und G-haltigen tRNA^{Asn} Isoacceptoren aus Rattenleberextrakten ist auch in vitro an Aminoacyl-tRNA-Synthetasen unterschiedlich (Singhal et al. 1983). Aus diesen Gründen sollten die Einflüsse der Modifikation Q auf die Proteinbiosynthese, insbesondere die Aminoacylierung der tRNA untersucht werden.

6.1.1. Isolierung von tRNA^{Asn} Isoacceptoren aus *Dictyostelium discoideum*

Dictyostelium discoideum wurde in einem axenischen peptonhaltigen Medium gezüchtet. Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeiten des Wachstums bei Zelldichten von 1×10^6 bis $1,7 \times 10^7$ geerntet. Hierbei zeigte sich, daß der tRNA-Gehalt kontinuierlich abfällt je dichter die Zellen werden. Treten die Zellen jedoch in die stationäre Phase ein, so nimmt der tRNA-Gehalt wieder zu (Abb. 9). Ein solcher Abfall ist ein Zeichen von tRNA-Abbau ohne ausreichende Neusynthese. Zu Beginn der stationären Phase wird dann tRNA wieder verstärkt neu synthetisiert.

Interessanterweise ist auch der DNA-Gehalt pro Zellkern sowohl von den Wachstumsbedingungen, als auch vom Alter der Zellen abhängig ist (Sharpe 1984): Der Wildstamm NC-4, der fast ausschließlich Q-haltige tRNA-Isoacceptoren enthält (Ott 1984), hat im exponentiellen Wachstum mit 0,25 pg/Zellkern den niedrigsten DNA-Gehalt, während der axenisch wachsende AX-2 in exponentiellem Wachstum (2×10^6) 0,29 pg DNA/Zellkern enthält. Den höchsten DNA-Anteil pro Kern haben stationäre Kulturen von AX-2, denn sie laufen in der G₂-Phase des Zellzyklus auf (Zada-Hames, Ashworth 1978).

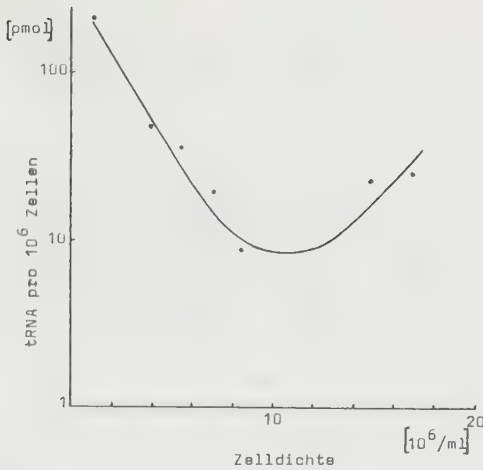


Abb. 9

Halblogarithmische Darstellung der Ausbeute an tRNA (in pmol/10⁶ Zellen) in Abhängigkeit von der Zelldichte zum Zeitpunkt der Ernte.

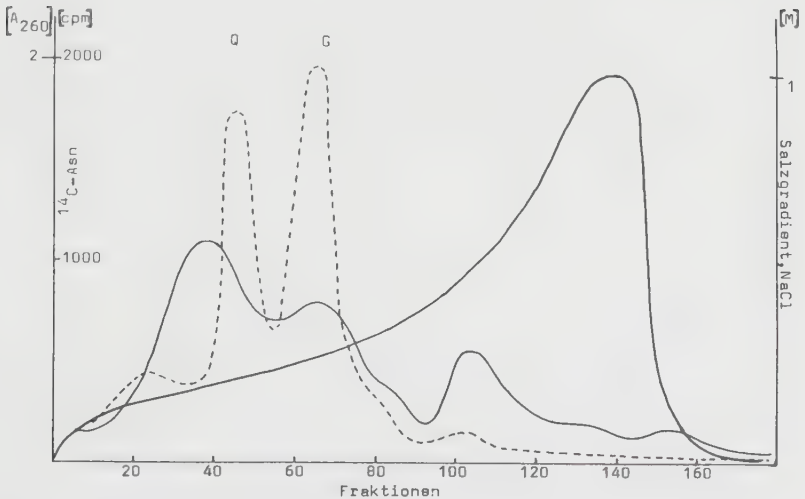


Abb. 10

Analytischer RPC-5 Säulenlauf von Gesamt-tRNA von *d. discoideum* aus dem vegetativen Stadium. Die tRNA wurde mit ³H-Asn beladen. Das Radioaktivitätsprofil (---) zeigt zwei Hauptisoacceptoren (Fraktion 50, 70) relativ zum optischen Profil (—). Drei "minor species" sind bei Fraktion 25, 82 und 100. Der Salzgradient, mit dem die Säule eluiert wurde, ist eingezeichnet. Die jeweilige Salzkonzentration ist an der rechten Abszisse abzulesen.

6.1.2. Trennung der Isoacceptoren der tRNA^{Asn} aus Dictyostelium discoideum

Die tRNA^{Asn} gehört zu den tRNAs der Q-Familie, so genannt, weil sie in der ersten Position des Anticodons anstelle eines Guanosin ein Queuosin enthalten. Neben der Q-haltigen tRNA^{Asn} kommen bei dem Stamm AX-2 noch größere Mengen Q-defizienter tRNA^{Asn} vor (Dingermann et al. 1981). Die beiden Isoacceptoren sind durch RPC-5-Säulenchromatographie aufgrund ihres unterschiedlichen Laufverhaltens deutlich zu trennen. (Abb. 10)

Daß es sich bei dem ersten der beiden Hauptisoacceptoren um den Q-haltigen handelt, läßt sich durch den sogenannte Periodat-shift nach Wosnik, White (1979) nachweisen. Dieser Nachweis beruht darauf, daß die cis-Diolgruppe im Cyclopentenring von Queuin oxidiert wird, wodurch die tRNA hydrophober wird, und so ihr Laufverhalten während der Elution ändert (nicht gezeigt). Die Methode ist bei Pistel (1982) ausführlich beschrieben.

Zellen, die logarithmisch wuchsen, hatten einen Anteil an Q-haltigem Isoacceptor von 38 % bis 48 %. Zellen, die in der stationären Phase geerntet wurden, enthielten nur noch 15-20 % Q-haltigen und zu 80 - 85 % G-haltige tRNA Isoacceptor (Abb 13). Nach der Ernte wurden die tRNA-Präparationen jeweils gleich durchgeführt, und auch für die Aminoacylierungen wurden jeweils dieselben Enzymchargen verwendet.

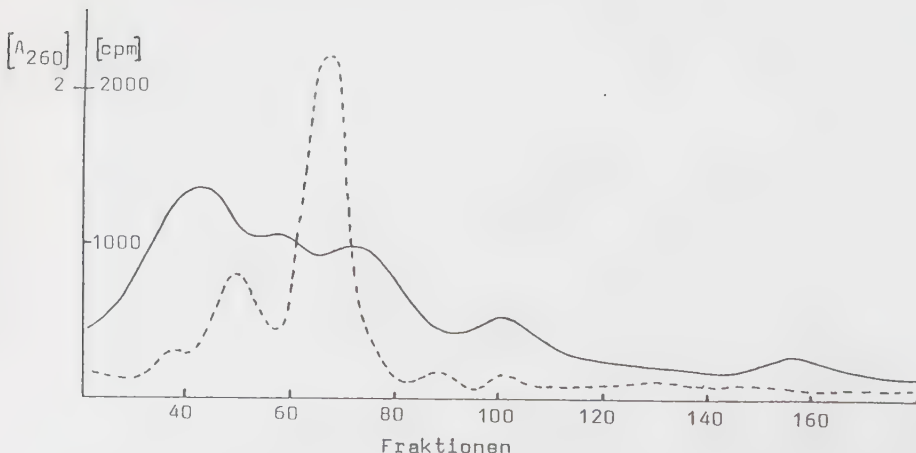


Abb. 11

Analytischer RPC-5 Säulenlauf. Trennung von Gesamt-tRNA von *D. discoideum* aus dem stationären Stadium. — bezeichnet das optische Profil, --- das Radioaktivitätsprofil. Zwei A260 wurden zu 48 pmol pro A260 mit ¹⁴C-Asn beladen und auf die Säule aufgetragen.

Die Aminoacylierung erfolgte in beiden Fällen nach den in 5.2.6.2. aufgeführten Standardbedingungen.

Mittels des so etablierten RPC-Systems und eines vorgeschalteten zweiten Säulenschritts wurde versucht, die beiden Isoacceptoren präparativ voneinander zu trennen. Dieses Verfahren ist schon unter ähnlichen Bedingungen von Dingermann (1980) angewendet worden. Für die erste Trennung an BD-Cellulose wurden 1300 A_{260} auf eine BD-Cellulose-Säule (siehe 5.2.3.) aufgetragen und mit einem NaCl-Gradienten eluiert. Mittels eines Suchtests wurden die tRNA^{Asn} enthaltenen Fraktionen detektiert und großzügig gepoolt.

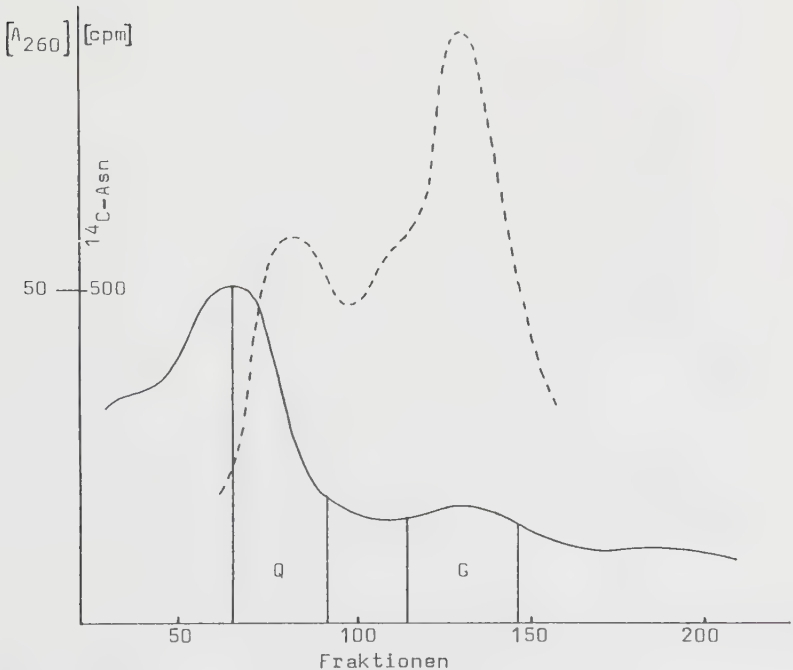


Abb. 12

Präparative Trennung von Gesamt-tRNA an einer BD-Cellulosesäule. Die markierten Flächen unter dem optischen Profil (—) wurden gemäß den Aktivitätsmaxima der Beladbarkeit getrennt gepoolt.

Die tRNA^{Asn} in den gesammelten Fraktionen wurden gefällt und erneut chromatographiert, diesmal auf einer RPC-5-Säule. Die Fraktionen, die zur Isolierung der Q- und G-haltigen tRNAs benutzt wurden, sind in Abb. 12 gekennzeichnet. Die Ausbeute an tRNA, in denen der Q-haltige bzw. der G-haltige Isoacceptor angereichert waren, betrugen 17 bzw. 14 A_{260} . Für Untersuchungen der Synthetasepräparationen wurden diese angereicherten Fraktionen verwendet.

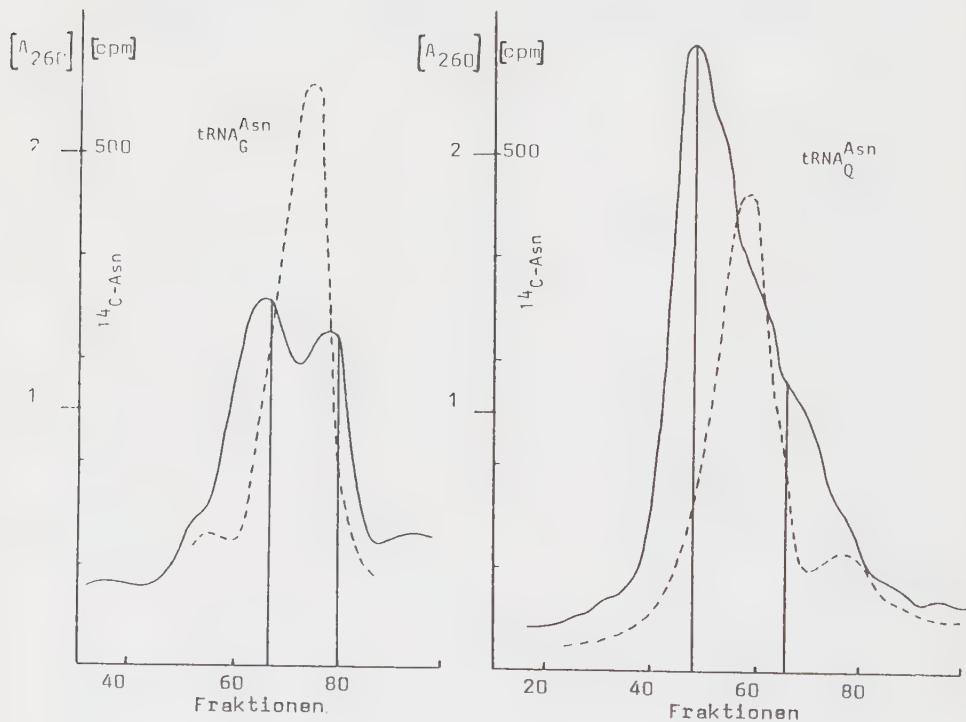


Abb. 13a, b

Präparative Trennung des Q- und G-haltigen tRNA^{Asn} Isoacceptors durch RPC-Chromatographie. Sammlung der Fraktionen anhand eines Suchtests (5.2.3.).

Wie der Abb. 10 zu entnehmen ist (vgl. auch Pistel 1982 und Ott 1984), treten außer den beiden Hauptisoacceptoren noch weitere Isoacceptoren in sehr geringer Menge auf ("minor species"). In einer einzigen Präparation lag ein tRNA-Gemisch vor, in dem die "minor species" in größerer Menge vorkamen.

Der Grund für diese Beobachtung ist nicht klar. Gezüchtet wurde wie üblich in HL-5 Medium. Geerntet wurde bei 7×10^6 Zellen/ml Medium. Vielleicht reflektiert dieses Isoacceptorenverhältnis eine ganz bestimmte, zeitlich eng begrenzte Entwicklungsphase.

6.1.3. Kinetische Untersuchungen zur Aminoacylierung von tRNA^{Asn}

Die beiden Hauptisoacceptoren unterscheiden sich durch das Vorkommen von Q bzw. G in der ersten Position des Anticodons. Um die Rolle dieser Modifikation für die Funktionsweise der tRNAs zu studieren, wurde das Verhalten der Isoacceptoren bei der Beladung mit Asn durch Aminoacyl-tRNA-Synthetasen verglichen. Es wurde versucht herauszufinden, ob unter verschiedenen Bedingungen die beiden Isoacceptoren unterschiedlich beladen wurden (s. Tabelle). Es war vermutet worden, daß modifizierte Nukleoside, insbesondere Queuosin, bei der Regulation aerober und anaerober Stoffwechselwege beteiligt sein könnten, daher wurden einige Aminoacylierungsansätze mit Sauerstoff bzw. Stickstoff begast. Die Produkte der Aminoacylierung wurden durch RPC-5- Säulen-Chromatographie analysiert. Nach "Phenolisierung" und Ethanol- Fällung wurde der jeweilige Aminoacylierungsansatz auf eine RPC-5-Säule aufgetragen und eluiert. Das Verhältnis der tRNA^{Asn}-Isoacceptoren wurde anhand der Aktivitätsverteilung in den einzelnen Fraktionen bestimmt. Als Enzymextrakt wurde tRNA-freier S-30 verwendet.

Tabelle

Beladungsverhältnisse der beiden Hauptisoacceptoren in Abhängigkeit von verschiedenen Parametern.

Incubations- Enzymmenge dauer (min) pro 100 ul		Begasung	Verhältnis Beladung tRNA ^{Asn} ₂ /tRNA ^{Asn} ₃ pmol/Λ ₂₆₀	
10	45 ug	-	23	40:60
10	20 ug	-	25	41:58
15	40 ug	-	30	42:58
30	80 ug	-	41	51:49
30	80 ug	-	41	55:45
30	80 ug	-	46	58:42
30	80 ug	N ₂	44	53:47
30	80 ug	N ₂ /GME	49	53:47
30	80 ug	O ₂	30	65:35

Bei niedriger (20-40 ug/100ul) Enzymkonzentration wurde der Isoacceptor III($\text{tRNA}_3^{\text{Asn}}$) besser beladen als II ($\text{tRNA}_2^{\text{Asn}}$), bei sehr hoher Enzymkonzentration jedoch wurde $\text{tRNA}_2^{\text{Asn}}$ um ca. 20 % besser beladen. Noch extremer ist dieses Verhältnis unter der Einwirkung von O_2 , während eine N_2 Begasung bzw. der Zusatz von BME als Oxidationsschutz für die SH-Gruppen der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen keinerlei Einfluß zeigte.

Zur Erklärung dieser Beobachtung wurden Versuche unternommen, die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen von Dictyostelium discoideum aufzureinigen (s.u.).

Im folgenden wurde versucht, die Kinetik (v_{max} , k_m) der Aminoacylierungsreaktion für die beiden Hauptisoacceptoren getrennt zu untersuchen. Die angereicherten Fraktionen der beiden Isoacceptoren (siehe 5.2.3.) wurden getrennt unter Standardbedingungen (siehe 5.3.2.) mit radioaktiv markierter Aminosäure beladen. Entnahmen von je 5 ul erfolgten nach 0,5 ,1 ,2 ,5 ,10, und 15 min. Die Enzymkonzentration (tRNA-freier S-100) betrug 8 ug/ul. Die Menge an eingesetzten angereicherten tRNA-Fraktionen wurde so gewählt , daß theoretisch die gleiche maximale Beladbarkeit erzielt werden konnte:

Fraktion von $\text{tRNA}_2^{\text{Asn}}$ (Q): 0,135 A_{260} = 25 pmol

Fraktion von $\text{tRNA}_3^{\text{Asn}}$ (G): 0,098 A_{260} = 25 pmol

Aus den Michaelis-Menten-Kinetiken ergaben sich folgende k_m -Werte für die beiden Isoacceptoren:

$\text{tRNA}_2^{\text{Asn}}$ (Q) 85,5 nmol/l

$\text{tRNA}_3^{\text{Asn}}$ (G) 76,7 nmol/l

Die für die beiden Isoacceptoren gemessenen v_{max} -Werte liegen für:

$\text{tRNA}_2^{\text{Asn}}$ (Q) bei 13,3 umol/min und für

$\text{tRNA}_3^{\text{Asn}}$ (G) bei 32,8 umol/min.

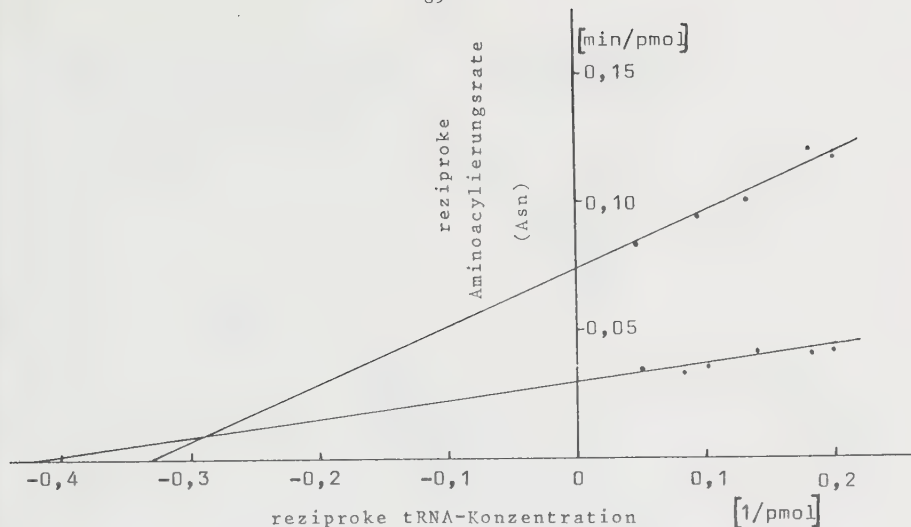


Abb. 14

Lineweaver-Burk-Diagramm zur Ermittlung des k_m und v_{max} des Q- und G-haltigen Isoacceptors. Die Einheiten der Abszisse sind in $1/\mu\text{mol}$, die der Ordinate in $\text{min}/\mu\text{mol}$.

Laut Singhal, Vakharia (1983) liegen die Werte für $tRNA^{Asp}$ genau umgekehrt: das v_{max} der Aminoacylierung ist für (G) $tRNA^{Asp}$ niedriger, der k_m -Wert höher als für die modifizierte tRNA (k_{mQ} 66 nmol/l, k_{mG} 120 nmol/l).

6.1.4. Die Anreicherung von Synthetasen

Im folgenden sollte versucht werden, die Aminoacyl-tRNA-Synthetase anzureichern, um weitere Unterschiede zwischen dem Q- und G-haltigen Isoacceptor herauszuarbeiten. In einer ersten groben Trennung wurden zwei katalytisch aktive Enzymfraktionen durch fraktionierte Ammonsulfatfällung erhalten. Der Gesamt-Extrakt einer S-30-Präparation (5.2.8.1.) wurde mit 45% gesättigtem Ammonsulfat (4°C) gefällt und anschließend mit 85 % Sättigung an Ammonsulfat nachgefällt. Wir erhielten eine "45 %-Fraktion" und eine "45-85 %-Fraktion". Bei der Aminoacylierung (5.3.2.) fiel auf, daß mit beiden Fraktionen nur eine sehr schlechte Beladung von $tRNA^{Asn}$ möglich war, jedoch konnte durch "Nachstarten" (verspätete Zugabe der jeweils anderen Enzymfraktion) ein mit dem Gesamt-Extrakt vergleichbares Ergebnis erzielt werden.

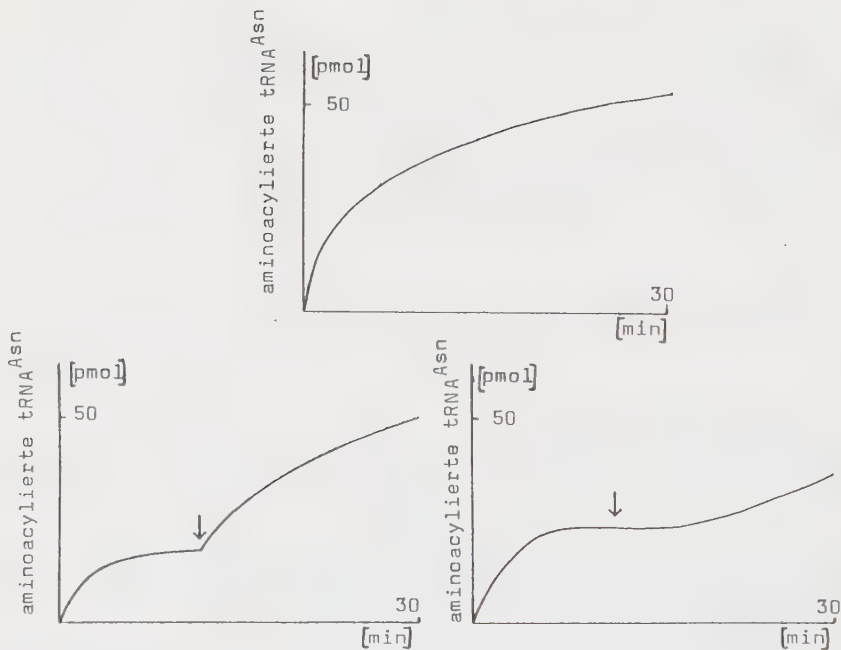


Abb. 15a, b, c

Beladungskinetiken von tRNA^{Asn} durch Enzymfraktionen, die durch fraktionierte Ammonsulfatfällung gewonnen worden waren.

- a) Gesamtfällung (0-85% Ammonsulfatsättigung)
 - b) 45% Fällung, nachgestartet (Pfeil) mit 45-85% Fällung
 - c) 45-85% Fällung, nachgestartet (Pfeil) mit 45% Fällung
- Aminoacyliert wurde jeweils ein A₂₆₀ an Gesamt-tRNA.

Nach jeweils 30 min wurden präparative Aminoacylierungsansätze, die parallel zu den eben beschriebenen Kinetiken angesetzt worden waren, durch "Phenolisieren" gestoppt und nach Ethanol-fällung auf RPC-5-Säulen aufgetragen. Dabei ergab sich, daß in Ansätzen mit Enzym aus Fällungsfractionen, in denen die beiden Aktivitäten nicht vereinigt worden waren, der Q-haltige Isoacceptor deutlich unterrepräsentiert vorlag.

Tabelle

Verhältnisse der Beladung der beiden Hauptisoacceptoren bei Verwendung der unterschiedlichen Enzymfraktionen zur Aminoacylierung.

Incubationsdauer 30 min

Enzymmenge ug/100 ul	Enzymfraktion	Verhältnis tRNA ^{Asn} ₂ /tRNA ^{Asn} ₃
40	45%	37:63
40	45- 85%	33:67
40+ 40	45-85% + 45%	52:48
20+ 20	45-85% + 45%	50:50

Da bei der fraktionierten Fällung mit Ammonsulfat Komponenten für die Aminoacylierung von tRNA^{Asn} getrennt wurden, wurde für eine weitere Anreicherung der Synthetasen eine Fällungsfraction zwischen 30 und 75 % Ammonsulfatsättigung (4°C) verwendet, die obiges Phänomen nicht zeigt. Diese Fraktionen wurden an einer Aminoethyl-Sepharose-Säule getrennt (5.2.8.3.). Das optische Profil des Laufs war undifferenziert (nicht gezeigt), jedoch das Profil der Enzymaktivitäten ergab zwei deutlich verschiedene Hauptaktivitäten.

Auffällig ist, daß sich beide Aktivitäten in der Geschwindigkeit, mit der sie tRNA^{Asn} beladen, deutlich unterscheiden. Die Enzymfraktion unter dem zweiten Peak ist weniger aktiv. Werden beide Enzymfraktionen jedoch mit den angereicherten tRNA-Fractionen getestet, so zeigt sich, daß der Q-haltige Isoacceptor zwar langsamer beladen wird, jedoch von beiden Enzymfraktionen.

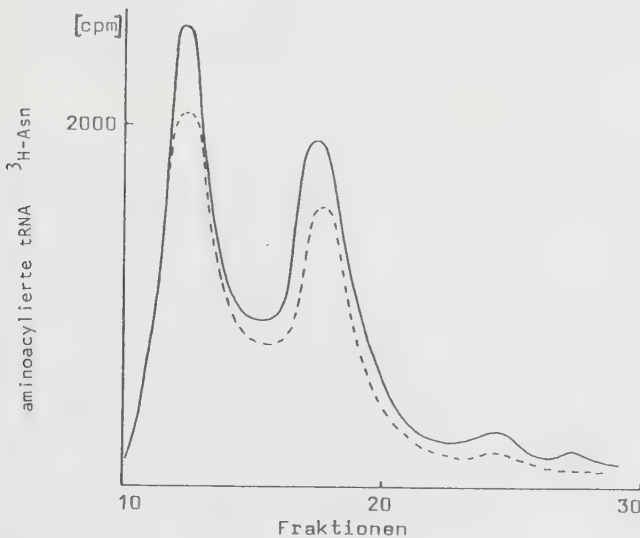


Abb. 16

Trennung einer durch fraktionierte Ammonsulfatfällung (30-75% Sättigung) gewonnenen Synthetasefraktion an AH-Sepharose. Sowohl das Radioaktivitätsprofil des 10 min (---) als auch das des 45 min (—) Beladungstests mit bulk-tRNA zeigen deutlich zwei Hauptaktivitätspeaks.

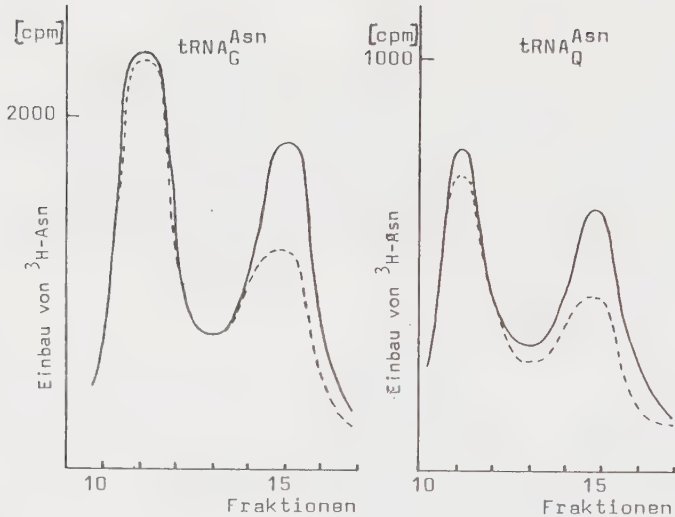


Abb. 17

Die durch hydrophobe Chromatographie gewonnenen Synthetasefraktionen wurden durch Aminoacylierungstests mit aufgereinigten Q- bzw. G-haltigen Isoacceptoren getestet. Die Entnahme erfolgte nach 10 (---) bzw. nach 45 (—) min. Von beiden Isoacceptoren wurde jeweils die Menge an tRNA eingesetzt, die, mit Gesamtextrakt (S-30) beladen, derselben maximalen Beladbarkeit (20pmol) entspricht.

6.1.5. In vitro Translationssystem

Beladene tRNAs werden am Ribosom zur Proteinbiosynthese verwendet. Um Auswirkungen der Modifikation Q in tRNAs an ribosomalen Reaktionen testen zu können, wurde versucht, ein in vitro Translationssystem für *Dictyostelium discoideum* zu etablieren. Erste Versuche käuflicher mRNA vom Phagen MS 2 mit einem S-100-Gesamt-Enzymextrakt und Ribosomen (ribosomale Fraktion vgl. 5.2.1.) von *Dictyostelium discoideum* zu translatieren, zeigten kein vom Leerwert (kein tRNA-Zusatz) signifikant abweichendes Ergebnis (nicht gezeigt). Bisher ist es trotz vieler Bemühungen in verschiedenen Arbeitskreisen nicht gelungen, ein effizientes Proteinbiosynthesystem von *Dictyostelium* zu etablieren. Gründe hierfür könnten eine hohe proteolytische Aktivität in Extrakten von *Dictyostelium* sein oder die Anwesenheit des von Mach (1982) bestimmten, für *Dictyostelium* spezifischen Polyamins Diaminopropan, das ein Hemmstoff der Proteinbiosynthese ist (Praisler et al. 1984). Es wurde vermutet, daß bei der Präparation der S-100 höhermolekulare Molekülkomplexe abgetrennt wurden, daher wurde mit einem S-30 weitergearbeitet. Deutliche Einbauraten wurden

erst erzielt, als anstelle von MS 2 mRNA und Ribosomen Polysomen von *Dictyostelium discoideum* verwendet wurden. Als polysomale Fraktion wurde der in Abb. 19 markierte Bereich gepoolt, wie er beim Abpumpen des Succrosegradienten erhalten wurde (siehe 5 2.1.).

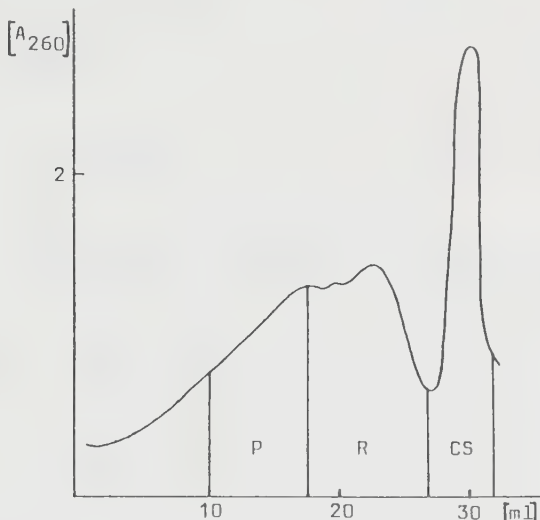


Abb. 18

Der Succrosegradient wird von unten angestochen und abgepumpt. Im Elutionsprofil sind die Bereiche mit Polysomen (P), mit wenigen und einzelnen Ribosomen (R) und der cytosolische Bereich (CS) markiert.

Aus 2 g Feuchtgewicht (Ernte bei 2×10^6 Zellen /ml) konnten 180 A_{260} Polysomen erhalten werden. Entsprechend dem unter 5.3.11. beschriebenen Ansatz wurden die einzelnen Ionenkonzentrationen in getrennten Optimierungsansätzen aufeinander abgestimmt. Die besten Einbauraten wurden erzielt bei einer Magnesiumkonzentration von 8,5 mM, einer Kaliumacetatkonzentration von 36 mM, einer Konzentration von Spermidin und Putrescin, die den Konzentrationen, die in *Dictyostelium discoideum*-Zellen vorliegen, entspricht, nämlich: 1 bzw. 8 mM und einer Enzymkonzentration von 60 μ g/Ansatz. Unter diesen Bedingungen wurde im Bereich zwischen 3 A_{260} und von 5 A_{260} Polysomen eine lineare Abhängigkeit der Einbaurate von der Polysomenkonzentration festgestellt.

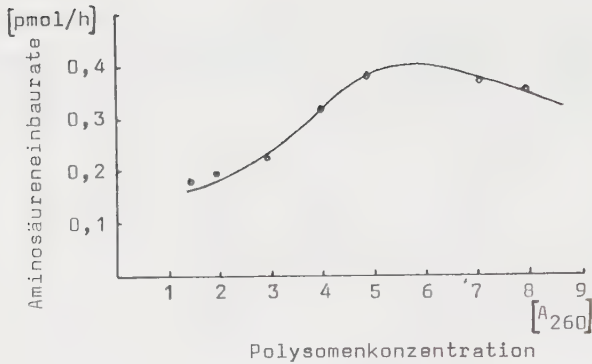


Abb. 19

Die Abhängigkeit der Aminosäureeinbaurrate (pmolAsn/h) von der Polysomenkonzentration in einem polysomenabhängigen homologen in vitro Translationsystem.

Für eine Polysomenkonzentration zwischen 3 und 5 A₂₆₀ erwies sich eine tRNA-Konzentration von 3,5 A₂₆₀ als angebracht. Maximal wurden 0,4 pmol Asn innerhalb einer Stunde eingebaut.

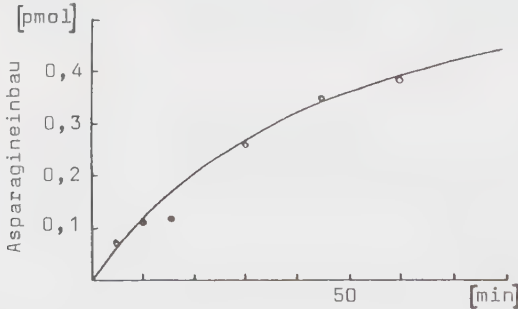


Abb. 20

Die Abhängigkeit des Asparagineinbaus in pmol von der Incubationsdauer in min.

Unter Berücksichtigung, daß Asn eher weniger häufig als andere Aminosäuren in Proteinen vorkommt, läßt sich daraus ein Gesamteinbau von 10¹¹ Aminosäuremolekülen pro Stunde errechnen. Unter Berücksichtigung der eingesetzten Ribosomenmengen läßt sich so abschätzen, daß zwischen 1 und 10 Aminosäuren pro Ribosom pro Minute in Proteine in vitro eingebaut werden.

6.1.6. Untersuchungen an EF-Tu von *E. coli*

Die Etablierung einer affinitätschromatographischen Methode, der die hohe Affinität des Elongationsfaktors Tu zu beladenen tRNAs zugrunde liegt, hatte zum Ziel, tRNA-Isoacceptoren von *Dictyostelium discoideum* in reiner Form darzustellen (Derwenskus et al. 1984, Fischer et al 1982).

Aus 128 g Bakterien (*E. coli* MRE 600) wurde nach der Methode von Lebermann et al. (1980) 65 mg EF-Tu isoliert. Entsprechend dem Profil des Suchtests (Bindungstest GDP) wurden die aktiven Fraktionen nach dem ersten Säulenlauf (CL-6 B vergl. 5.2.10.) gepoolt Abb. 22. Dieser Pool wurde auf eine AcA-44-Säule (5.2.10.) aufgetragen. Danach lag der EF-Tu hinreichend sauber vor.

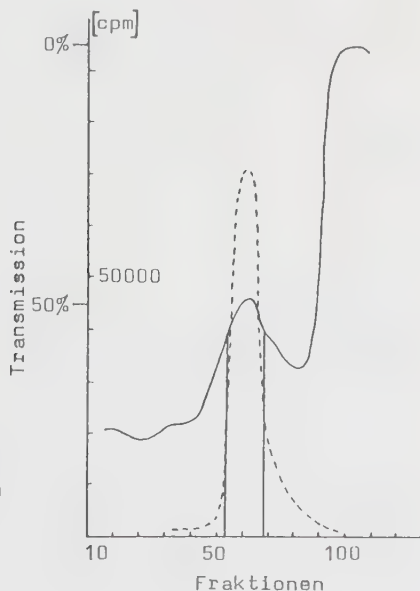


Abb. 21

Das optische Elutionsprofil (—) des *E. coli* Extrakts nach Elution von einer CL-6B Säule. Entsprechend dem Suchtest mit ^3H -GDP wurden die aktiven Fraktionen gepoolt.

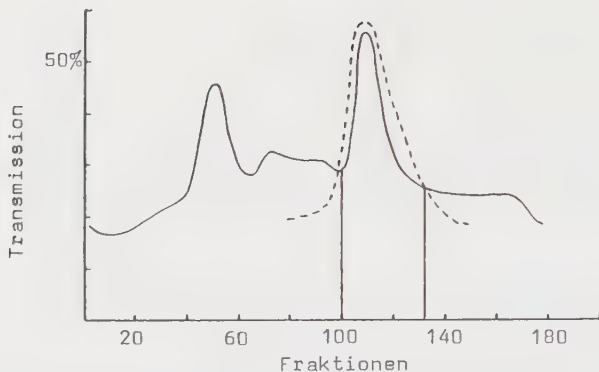


Abb. 22

Die EF-Tu-haltigen Fraktionen der Ionenaustauschchromatographie wurden nach Ammonsulfatfällung auf einer AcA-44 Säule nachgereinigt. Die Übereinstimmung des optischen (—) und des Radioaktivitätsprofils (---) deutet eine hohe Reinheit der gewünschten Enzymfraktion an.

Der so angereicherte Elongationsfaktor Tu wurde an CN-Br-aktivierte Sepharose gekoppelt, wie unter 5.2.10.1. beschrieben.

Etwa 85 % des Proteins konnten an die Säulenmatrix gebunden werden (5.2.10.2). Der immobilisierte Faktor besitzt noch dieselbe Spezifität wie der lösliche (Fischer et al. 1982). Zur Bindung von tRNA muß der EF-Tu-GDP in den EF-Tu-GTP-Komplex umgewandelt werden (5.2.6.3.). Das geschieht durch Incubation mit Pyruvatkinase, Phosphoenolpyruvat und GTP. An den so aktivierten EF-Tu bindet aminoacylierte tRNA mit Dissoziationskonstanten zwischen 10^{-6} und 10^{-8} molar. Abb. 23 zeigt ein typisches Elutionsprofil für die Isolierung von Asn-tRNA^{Asn}.

Eine Säule von ca. 6 ml Bettvolumen (für ca. 30 mg EF-Tu) wurde mit 5 A₂₆₀ Gesamt-tRNA, selektiv beladen mit Asn, beschickt. 26 bis 35 % der beladenen tRNA^{Asn} wurden unter diesen Umständen in der HS-Fraktion eluiert. Die maximale Auftragsmenge an tRNA ist 20 A₂₆₀ bei einer Ausbeute an aminoacylierter tRNA von etwa 15 %. Die Hauptursache für eine nicht noch höhere Ausbeute ist wohl darin zu sehen, daß der pH der verwendeten Puffer relativ alkalisch war und tRNA unter diesen Umständen leicht deacyliert. Die HS-Fractionen wurden mit Ethanol präzipitiert und auf einer RPC-5-Säule getrennt (5.2.4.). Abb. 24 zeigt das optische Elutionsprofil eines RPC-5-Laufs einer HS-Fraktion.

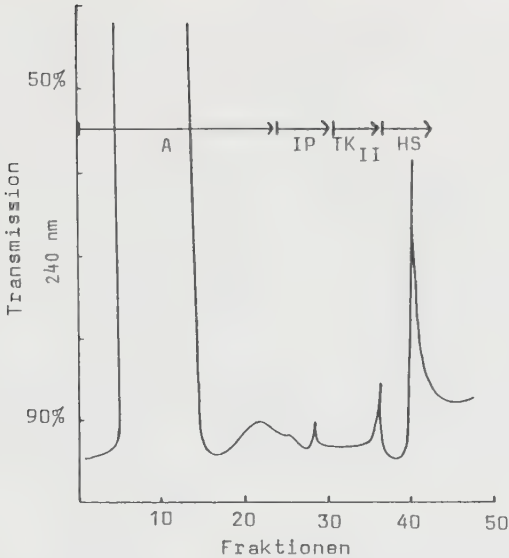


Abb. 23

Der Verlauf einer Affinitätschromatographie wurde anhand des Transmissionsspektrums verfolgt. Die Pfeile geben den Start und die Dauer der Elution der einzelnen Puffer an (5.2.6.4.).
 A: Aktivierungspuffer und Auftrag der tRNA; Elution mit TK_{II}-Puffer
 IP: Elution mit Intermediärpuffer
 TK_{II}: 2. Elutionsphase mit TK_{II}
 HS: Hochsalzpuffer, Elution der gebundenen Asn-tRNA^{Asn}

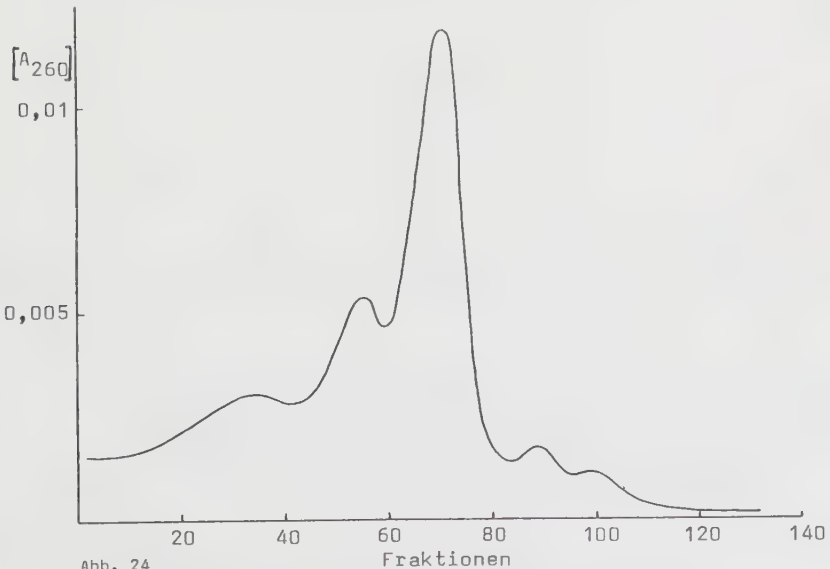


Abb. 24

Die Fraktionen der Affinitätschromatographie, die reine aminoacylierte tRNA enthielten (HS-Fraktionen) wurden nach Ethanol-fällung auf einer RPC-5 Säule weiter aufgereinigt. Das optische Elutionsprofil zeigt die Auftrennung einer tRNA-Spezies (tRNA^{Asn})

Der Bereich der beiden Hauptisoacceptoren wurde wie beschrieben (5.2.6.) aufgearbeitet und für weitere Untersuchungen (siehe Hybridisationen) verwendet. Aus 70 A_{260} Gesamt-tRNA wurden insgesamt 6 μ g reine Isoacceptoren erhalten.

Untersucht man anhand des jeweiligen Radioaktivitätsprofils das Verhältnis der beiden Hauptisoacceptoren für die einzelnen Elutionsfraktionen der EF-Tu-Säule, so zeigt sich eine unterschiedliche Affinität des EF-Tu für die Q_{34} - bzw. G_{34} -haltige $tRNA^{Asn}$. In der zu Anfang eluierten Fraktion wird, zusammen mit den nicht acylierten tRNAs, mehr Q_{34} - $tRNA^{Asn}$ eluiert (Verhältnis $tRNA_Q^{Asn} : tRNA_G^{Asn}$ 75 : 25), während in den Fraktionen, die mit IP-Puffer eluiert werden, in etwa das Verhältnis vorliegt, das auch in bulk-tRNA vorliegt (Verhältnis 45 : 55). In der HS-Puffer-Fraktion jedoch liegt der G_{34} -haltige Isoacceptor stark überrepräsentiert vor (Verhältnis 30 : 70). Abb 25 a,b,c zeigt die entsprechenden Aktivitätsprofile.

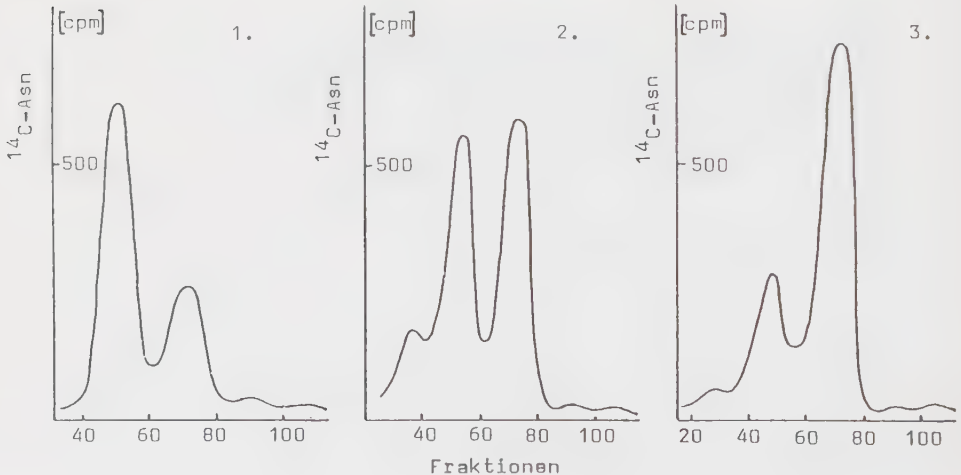


Abb. 25a, b, c

Die Fraktionen der Elution der Affinitätssäule mit den einzelnen Puffern (1. Elution mit TK_{II} 2. Elution mit IP 3. Elution mit HS) wurden gesammelt und einzeln einer RPC-S Chromatographie unterworfen. In allen Fällen wurde etwa die gleiche Menge an säurefällbarer Radioaktivität (=aminoacylierte tRNA) aufgetragen. Das Radioaktivitätsprofil in Teil 1. gibt das Verhältnis der beiden Isoacceptoren für $tRNA^{Asn}$ für die TK_{II} , in Teil 2. für die IP und in Teil 3. für die HS Fraktionen wieder.

Um zu untersuchen, ob tatsächlich eine höhere Aktivität der aminoacylierten G_{34} -tRNA zu EF-Tu besteht, oder ob dieser Effekt durch die Säule bedingt ist, wurde ein unabhängiges Verfahren angewendet. Der Bindungstest, der unter 5.3.8. beschrieben ist, wurde mit angereicherten tRNA-Isoacceptoren durchgeführt, die getrennt mit Asn beladen worden waren. Da der ternäre Komplex EF-Tu- 3H -GTP-AsntRNA^{Asn} den NC-Filter beim Absaugen passieren kann, der binäre Komplex EF-Tu- 3H -GTP jedoch nicht, sollten die Werte der Tests für den Q_{34} -haltigen Isoacceptor deutlich über denen des G_{34} -haltigen liegen, was auch bestätigt werden konnte: Leerwert (ohne tRNA-Zusatz) 1200 cpm, Ansatz mit Q_{34} -tRNA^{Asn} 780 cpm, Ansatz mit G_{34} -tRNA^{Asn} 700 cpm). Effekte, die in heterologen Systemen (EF-Tu von E. coli) erzielt werden, lassen natürlich nicht zwingend auf die Verhältnisse in vivo schließen. Ferner sollte berücksichtigt werden, daß tRNAs der Q-Familie (tRNA^{Tyr}, tRNA^{His}, tRNA^{Asp} und tRNA^{Asn}) bei manchen Organismen ein hypermodifiziertes Q enthalten.

Arbeiten von Ott et al. (1982) zeigten, daß Queuosin von Dictyostelium aus dem Medium aufgenommen wird. Nachdem unserem Arbeitskreis von Dr. Nishimura die Base Q zur Verfügung gestellt worden war, war es möglich geworden, Dictyostelium discoideum in "synthetischem" Medium mit und ohne Q-Zusatz zu züchten. Es zeigte sich, daß modifizierte Nukleoside, insbesondere Queuosin, eine regulatorische Funktion bei der Umschaltung aerober und anaerober Stoffwechselwege hat. Daraus ergaben sich neue Arbeitshypothesen zur Funktion von Q in tRNA (Kersten 1984).

Da tRNA-Gene und die nachfolgende Modifikation der Transkripte auch genregulatorische Funktion haben könnten, wurde im folgenden versucht, aus Dictyostelium discoideum ein tRNA-Gen einer tRNA aus der Q-Familie zu klonieren und Struktur und Organisation zu untersuchen.

6.2.1.1. Bestimmung der Zahl der tRNA^{Asn}-Gene im haploiden Genom von *Dictyostelium discoideum*

Nach den unter 5.2.7. beschriebenen Methoden wurde hochmolekulare genomische DNA von *Dictyostelium discoideum* hergestellt.

Um die Kopienzahl der tRNA^{Asn}-Gene auf dem *Dictyostelium discoideum* Genom zu bestimmen, wurde die so präparierte DNA vollständig mit Eco R I und Hind III verdaut, auf einem 0,5 %igen Agarosegel nach Größe getrennt und durch Southern-Transfer (siehe 5.4.1.1.) auf Nitrocellulose-Filter überführt. Als Hybridisationsprobe wurde hochreine tRNA^{Asn} verwendet, die nach einer affinitätschromatographischen Methode erhalten worden war (siehe 5.2.6.) und keine signifikanten Verunreinigungen anderer tRNAs oder 5-S RNAs enthielt. Diese tRNA (1-2 ug) wurde mit ¹²⁵I radioaktiv markiert (siehe 5.3.6.), gelektrophoretisch nachgereinigt und ohne Elution aus dem PAA-Gel zur Hybridisation verwendet.

Jeweils 5 bis 6 Banden radioaktiver Signale wurden auf dem Filter der DNA-Verdaus mit Eco RI bzw. Hind III detektiert.

Somit liegen mindestens 5 Abschnitte auf jedem *Dictyostelium discoideum* Genom vor, die der tRNA^{Asn} komplementär sind. Die Größe der entsprechenden Fragmente liegt für die mit Hind III behandelte DNA bei 13.0, 9.3, 4.8, 3.3, 2.0 kb und für die Eco R I behandelte DNA bei 7.8, 5.6, 3.8, 3.0 und 2.3 kb. Daraus ergibt sich, daß der verwendete Stamm von *Dictyostelium discoideum* für mindestens 5 tRNA^{Asn}-Gene auf seinem Genom codiert. Diese Anzahl liegt in der erwarteten Größenordnung, denn Peffley und Sogin (1981) hatten für ein tRNA^{Trp}-Gen eine Kopienzahl von 6 ermittelt.

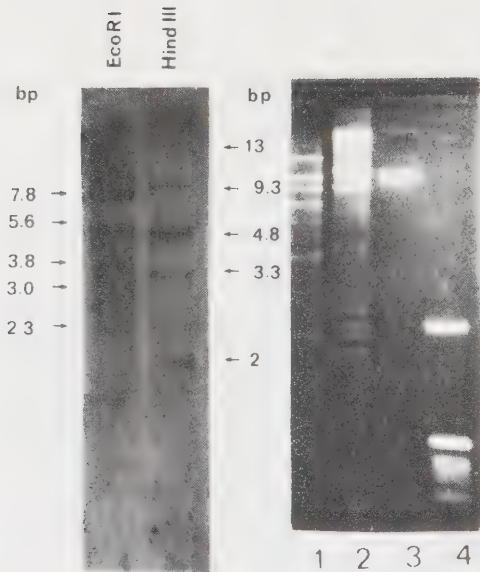


Abb. 26

Bestimmung der $tRNA^{Asn}$ -Genkopien im Genom von *D. discoideum*. Genomische *D. discoideum*-DNA wurde mit *Eco* R I und *Hind* III verdaut und nach Größe auf einem 0,5%igen Agarosegel fraktioniert (rechts, Spalte 1 und 2). Als Größenmarker dienten M 13 mp 8 RF-DNA (*Eco* R I verdaut: 7229 bp) (rechts, Spalte 3) und pBR 322 DNA (*Hinf* I verdaut) (rechts, Spalte 4). Sichtbare DNA-Banden in den genomischen Verdauen enthalten hochrepetitive rDNA-Sequenzen (vergl. Peffley und Schin 1981). Der linke Teil der Abbildung zeigt Banden, die eine ausreichende Homologie mit $tRNA^{Asn}$ aufweisen, um mit radioaktiv markierter $tRNA^{Asn}$ zu hybridisieren.

6.2.1.2. Klonierung eines DNA-Fragments von *Dictyostelium discoideum*

6.2.1.2.1. Erstellung einer genomischen "Genbank" von *Dictyostelium discoideum* im Phagen λ 590

Um weitere Daten über die Organisation und Struktur von $tRNA^{Asn}$ -Genen zu erhalten, sollte eines der $tRNA$ -Gene isoliert werden. Dazu wurde eine Genbank konstruiert. Genomische DNA von *Dictyostelium discoideum* (1,5 μ g)

wurde mit Hind III verdaut und mit 3 µg ebenfalls mit Hind III linearisiertem Vektor λ 590 ligiert. Die ligierte DNA wurde in vitro in Phagenpartikel verpackt und ergab ca. 600 000 Plaques, die nach Amplifikation auf Platten mittels Kolonie-Hybridisation untersucht wurden. Als Probe für diese Hybridisation diente mit ^{125}I markierte hochreine tRNA^{Asn}. 12 positive Signale konnten durch Autoradiographie erhalten werden. Einer dieser positiven Phagen, der also ein der tRNA^{Asn} homologes Stück der genomischen DNA von Dictyostelium discoideum aufgenommen haben sollte, wurde genauer charakterisiert. Dieser Phage (λ 2.1.) enthielt ein 2 kb langes Hind III-Fragment. Drei weitere Dictyostelium DNA-Fragmente aus anderen Phagen (λ 18/1, λ 17/1, λ 7/1) hybridisierten ebenfalls mit ^{125}I -tRNA^{Asn}. Die Fragmentgrößen waren 9,3, 4,8 und 3,3 kb.

6.2.1.2.2. Reklonierung

Das 2 kb-Fragment aus λ 2.1 wurde in dem Plasmid-Vektor pUC-8 rekloniert. Dazu wurden 2,5 µg λ -DNA mit Hind III verdaut und mit 0,75 µg Hind III geschnittener, dephosphorylierter Plasmid-DNA ligiert. Das nach der Transformation im Bakterienstamm JM 103 vorliegende Plasmid wurde pDDt 2 genannt. Das ebenfalls erhaltene Plasmid pDDt 1 enthält dieses Fragment zweifach in beiden Orientierungen. Das 2000 bp Insert enthält eine interne Bam H I-Schnittstelle, die das Fragment in einen längeren (1200 bp) und einen kürzeren (800 bp) DNA-Abschnitt unterteilt. Die Plasmide wurden mit Hind III und Bam H I doppelt verdaut, nach Größe auf einem Agarosegel (0,7 %) getrennt, nach Southern (1975) auf NC-Filter transferiert und gegen ^{125}J -tRNA^{Asn} hybridisiert.

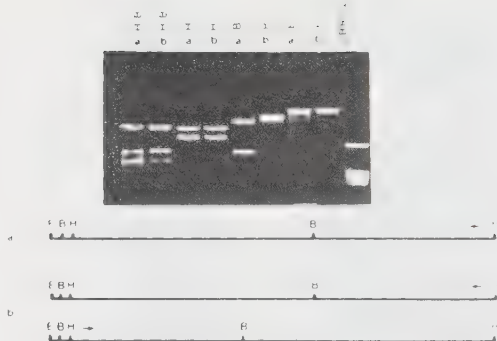


Abb. 27

Verdau der Plasmide pDDt 2 (a) und pDDt 1 (b) mit den REN Eco R I (E), Hind III (H) und Bam H I (B) sowie eine schematische Darstellung der daraus abzuleitenden Anordnung der entsprechenden REN-Schnittstellen im Bereich der "multiple cloning site".

Diese Hybridisation zeigte, daß der der tRNA^{Asn} homologe DNA-Abschnitt auf dem 800 bp Hind III/Bam H I-Fragment liegt. Zur weiteren Charakterisierung dieses DNA-Abschnitts, sollte er sequenziert werden. Dies sollte nach der Dideoxy-Methode von Sanger et al. (1977) mit Hilfe der einzelsträngigen Phagen M 13 mp 8 und M13 mp 9 geschehen. Dieser Phage liegt während seines Replikationszyklus innerhalb der Wirtszelle in einer circulären, doppelsträngigen, extrachromosomalen Form vor und kann in dieser Form als Klonierungs-Vektor verwendet werden (vgl. Material). In diesem mit Hind III und Bam H I geschnittenen Vektor M 13 mp 8 (0,5 ug) wurde 0,15 ug des 800 bp Hind III/Bam H I DNA-Fragments aus pDDt 2 ligiert. So wurde ein Klon des M 13-Phagen erhalten, von dem dieses Fragment sowohl in der doppelsträngigen Form (Präparationen dieser DNA enthielten die Bezeichnung d₈ Ddt 800), als auch in der einzelsträngigen (s₈ Ddt 800) isoliert werden konnte. Im Phagen M 13 mp 9 sind die Restriktionsstellen anders angeordnet, so daß darin das DNA-Fragment in der umgekehrten Orientierung vorliegt: Entsprechende DNA-Präparationen wurden mit d₉ Ddt 800 bzw. s₉ Ddt 800 bezeichnet. Da 800 bp zu lang sind, um direkt sequenziert zu werden,

wurden von beiden Enden des Fragments her Deletionsklone konstruiert. Dazu wurde d_8 Ddt 800 (35 ug) mit Hind III (5'-Deletionsklone) oder mit Bam H I (3'-Deletionsklone) verdaut. Nach dem partiellen Verdau mit Bal 31 (vgl. Methoden) und der darauf folgenden "fill-in"-Synthese lagen unterschiedlich lange Fragmente mit "stumpfen" Enden vor. Ein weiterer Verdau mit Bam H I (5'-Deletionsklone) bzw. Hind III (3'-Deletionsklone) ermöglichte eine Reclonierung in M 13 mp 8 mit definierter Orientierung. Vgl. Schema Abb. 28

Schema (am Beispiel eines 5'-Deletionsklons) der Bal 31-Strategie.

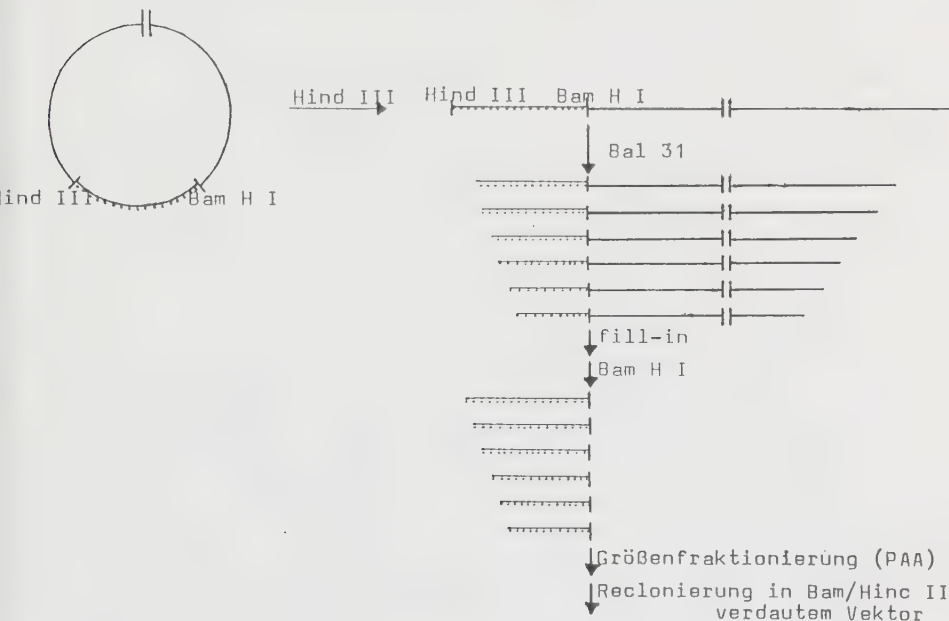


Abb. 28

Die RF-DNA eines passenden Klon eines M 13-Phagen wurde mit Hind III (nahe dem Insert) linearisiert. Die prozessive Exonuklease Bal 31 verdaut nun die lineare DNA von beiden Seiten her. Durch Phenolisierung wird sie denaturiert, und die Bruchstücke erhalten mittels Klenow-Enzym und den 4 dNTP "stumpfe" Enden. Nach dem abschließenden Bam I-Verdau werden die Fragmente nach Größe fraktioniert (die Fragmente des Vektors sind alle wesentlich größer als das Insert). Es folgt Reclonierung der Fragmente in M 13-Phagen (geschnitten mit Bam H I und Hinc II).

Dabei wurde ein tRNA-Gen identifiziert, das entsprechend dem Anticodon für eine tRNA-Valin codiert. Dieses Gen liegt etwa 60 Basen "flußabwärts" (downstream: vom 5'-Ende zum 3'-Ende) der Hind III-Schnittstelle. Dieses Gen erhält alle invarianten und semiinvarianten Nukleotide, die für eukaryontische tRNAs bekannt sind (Gauss und Sprinzl 1984). Ein CCA-Ende ist wie bei allen eukaryontischen tRNA-Genen, nicht codiert. Dieses Gen erfüllt alle Bedingungen für geninterne tRNA-Promotoren, wie sie für eukaryontische tRNA-Gene von diversen Organismen aufgestellt worden sind (Cilberto et al. 1982, Galli et al. 1981, Hofstetter et al. 1981, Sharp et al. 1981a). Der für den Stop der Transkription übliche "T-stretch" auf dem nicht codierenden Strang folgt nach 12 (4 T-Nukleotide) und nochmals nach 28 Nuklotiden (4 T-Nukleotide).

Ein tRNA^{Val}-Gen mit einer tRNA^{Asn} als Probe zu finden, war ein unerwartetes Ergebnis. Deshalb wurde die Sequenz des 800 bp Hind III/Bam H I Fragments nochmals nach tRNA-Genen abgesucht. Kein tRNA-Gen, jedoch eine tRNA-ähnliche Struktur wurde im 5'-flankierenden Bereich des tRNA^{Val}_{GUU}-Gens gefunden, die sogar z.T. mit dem Struktur-Gen überlappt. Dieser Struktur fehlt ein Teil ihrer 5'-Acceptorstammregion, da dort eine Hind III-Stelle liegt, die als Klonierungsstelle verwendet wurde. Obwohl einige Nukleotide in der D-Loopregion fehlen, ein ungewöhnlich langer Extraarm vorhanden ist und die Region des T-Loops zuviele Nukleotide enthält, findet man doch sovielen konservierte Nukleotide (Gauss, Sprinzl 1984), daß man diese Struktur als "tRNA-Pseudogen" ansprechen kann. Das Pseudogen hat das Anticodon einer tRNA^{His}_{CAU}: AUG.

Die restliche Sequenz, im Anschluß an das tRNA^{Val}_{GUU}-Gen ist extrem AT-reich (74 %). Das ist unter Eukaryonten nicht besonders häufig, jedoch für Dictyostelium discoideum nicht ungewöhnlich. Der Mittelteil des Fragments war nach der Exonuklease Bal 31 Strategie überlappend auf beiden Strängen sequenziert worden (Abb. 30). Die gesamte Sequenz des 800er Basenpaar-Fragments ist in Abb. 31/32 dargestellt.

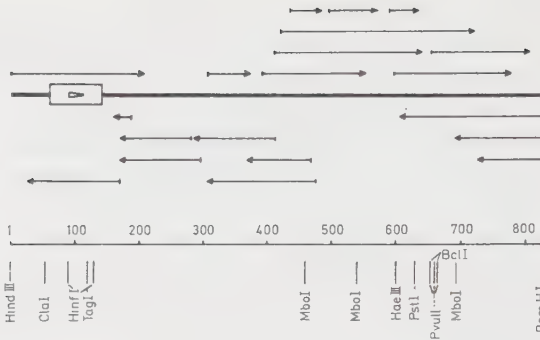


Abb. 30

Schematische Darstellung eines 800 bp Hind III/Bam H I-Fragments aus pDDt 2. Pfeile über der dicken Linie zeigen den Beginn der Deletionsmutanten in M 13 mp 9, die darunter die von Deletionsklonen in M 13 mp 8. Lage und Transkriptionsrichtung des $tRNA^{Val}$ -Gens sind durch die Kästchen auf der dicken Linie angezeigt. Unten sind die Schnittstellen einzelner REN angegeben.

```

1      10      20      30      40      50      60      70      80
AAGCTTCAATGATAGAAATTTAAACGGGTATGAGTATTTAACATGAAAAATATCGATTAGTTCGGAICGGTGTAGTCCG
-----
TTATCACGAATCCTTAACACGGATTAGGTCTGGGTTCGATCCCCCTCTGAATACAACTAATACTTTCCCAAAGACA
-----
AATTTTCATAGTCAAAAGTTCGATCCAGAAGAAATTCGAGTCTTGAAAAAAGTAATTTAGCAATTTATTTAAAA
TTTTAATACCTTTTAAATCATTTAATTTATATAATTTAGTTTCTTTTATTATATATTTCATCCTATAAAACATAAAA
CCAAAAAATTTATGAATTTGATGGTTAAATACTAATTAGTTAATATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAAAATGTTG
GTGAATTTTAAATACACAAATCCAATAAAAAAATTTAATAAAAAACAGCAAAAGTCAAAAAAATAAACAATA
TAAAAATATAAATGATAGGAATGAATTTAAAGATTTATTTATTTAAACATTTAGATCAATAATTATTAATTATTTCT
AAGAATATCAGCCTAAAGAGTTATTTAAATAAAAGCCAGAGAAATTAACATGCAGTTAAACAAAATGATGAATAAT
TCTTAAACTTGAGTTTGGATGATCACCATCAGCTGAAGTATCATCACCAGTTGCAGATCCAGTAGCTGAACCACTTGAAG
AAGTAGTAGCACCAGTTGAAGAAGTAGCAGAACAGTAGTGGTTCGAACCTGGTTTATCAACTTCACCAGATTGATAGTTTG
AGCACCTAATGTTGGATCC

```

Abb. 31

Primärsequenz des 800 bp Hind III/Bam H I-Fragments aus pDDt 2.

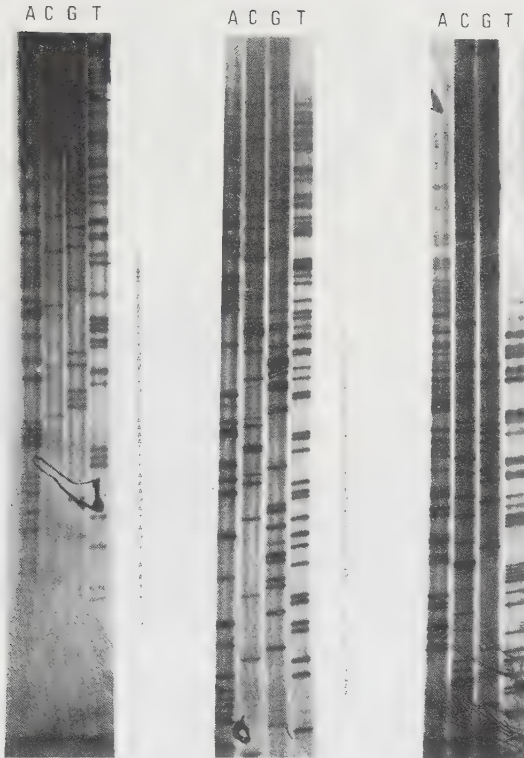


Abb. 32

Photo des Autoradiogramms der Sequenzierung des tRNA-"Genpaares".

Es war erwartet worden, ein tRNA^{Asn}-Gen zu finden. Die Begründung für das vorliegende Ergebnis ist evtl. in der Methodik zu suchen, die angewandt wurde, um das Gen zu isolieren. Die Möglichkeit, daß die tRNA-Präparation mit tRNA^{Val} kontaminiert ist, ist aus mehreren Gründen unwahrscheinlich. Erstens wurden die tRNA-Präparationen nach der Affinitätschromatographie und der Nachreinigung der Isoacceptoren auf Beladbarkeit mit sowohl ³H-Asn als auch ³H-Valin geprüft. Bei einem Leerwert von ca. 200 cpm wurde für ein Aliquot der Präparation ein Wert von 11 500 cpm für Aminoacylierung mit ³H-Asn erhalten, was einer Beladbarkeit von 1200 pmol pro A₂₆₀ entspricht. für ³H-Valin jedoch lagen die Werte in der gleichen Höhe wie die Leerwerte (800 Cpm ohne tRNA-Zusatz, 720 Cpm mit). Zweitens wurde bei der

Reinheitsüberprüfung der tRNA-Präparation mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese nur eine Bande detektiert (nicht gezeigt).

Drittens ist die zur Deacylierung der bulk-tRNA verwendete Methode, die ja ausschlaggebend für die Affinitätschromatographie ist, sehr effizient (Schofield, Zamecnik 1968), was die Anwesenheit einer sehr stabil beladenen tRNA unwahrscheinlich erscheinen läßt. Jedoch ist eine Mitaufräumung von tRNA^{Val} aufgrund von Codon-Anticodon-Wechselwirkung (Grosjean et al. 1976) nicht auszuschließen, da die tRNA^{Val} ein zu tRNA^{Asn} komplementäres Anticodon besitzt: tRNA^{Asn}-Sequenz 33^{UGUUA}₃₇; tRNA^{Val}_{GUU}-Sequenz 33^{UAACA}₃₇. Sehr viel wahrscheinlicher ist jedoch die Möglichkeit, daß die Stringenz der Hybridisation von tRNA^{Asn} an ihr korrespondierendes Gen durch die Iodierung so stark sank, daß eine stabile Interaktion mit dem tRNA^{Val}_{GUU}-Gen ermöglicht wurde. Das würde heißen, daß die tRNA^{Asn} unter diesen Umständen auch mit tRNA^{Val}-Gensequenzen hybridisiert. In diesem Fall sollten jedoch bei der Hybridisierung des isolierten tRNA^{Val}-Gens gegen genomische DNA keine zusätzlichen Banden auftreten. Das ist aber der Fall, und diese zusätzlichen Banden wären dann nicht zu erklären, denn die Sequenz des Pseudogens und auch die 3'-flankierenden Sequenzen des tRNA-Gens sollten nicht so oft auf dem Genom reiteriert sein.

Als vierte Möglichkeit bietet sich an, daß die Sequenz des Pseudogens weitgehend homolog zur Sequenz des tRNA-Gens ist. Um das zu entscheiden sollte jedoch die Primärsequenz aller authentischen tRNA-Gene bekannt sein. Hybridisationsexperimente gegen bulk-tRNA (5.1.2.4.1) und genomische DNA (5.1.4.2.), die unter 6.2.1.4. beschrieben sind, sprechen jedoch dafür.

6.2.1.4. Hybridisationsexperimente

6.2.1.4.1. Hybridisation des 800 Basenpaar langen DNA-Fragments von Dictyostelium discoideum gegen bulk-tRNA

Um festzustellen gegen welche der tRNA-Spezies das 800 bp Fragment, das das Pseudo- und Valin-Gen enthält, hybridisiert, d. h. zu welcher tRNA eine ausreichende Homologie vorliegt, wurde Gesamt-tRNA von Dictyostelium discoideum auf einem zweidimensionalen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Die getrennten tRNAs wurden dann auf ein Nitrocellulose-Filter transferiert (Northern procedure). Das 800 bp Fragment wurde durch T₄-Markierung ("fill-in"-Synthese 5.3.7.) unter Zugabe von ³²P-dATP (1 µl) radioaktiv

markiert. Das ^{32}P -markierte Fragment wurde als Hybridisationsprobe verwendet. Auf dem Autoradiogramm waren sechs deutliche Signale zu lokalisieren. Die drei stärksten stimmen nach ihrer Lage auf dem zweidimensionalen Gel mit Regionen überein, die von Dingermann et al. (1981) als tRNA^{Val} identifiziert worden sind. Von den drei anderen Signalen konnte eines an der Stelle von tRNA^{Asn} und die beiden restlichen bei tRNA^{His} nachgewiesen werden.

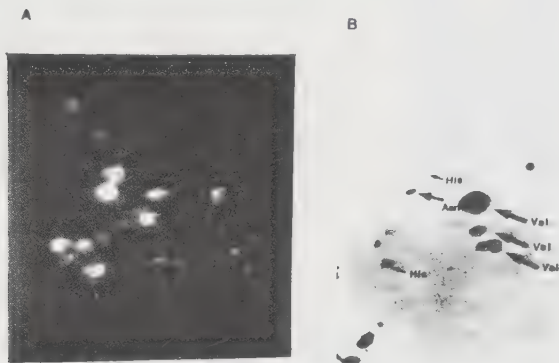


Abb. 33

- A) Zweidimensionale Trennung von Gesamt-tRNA aus *D. discoideum* durch PAGE. Anfärbung mit Ethidiumbromid.
 B) Hybridisation des 800 bp Hind III/Bam H I-Fragments aus pDDt 2 gegen die zweidimensional getrennte tRNA. Pfeile zeigen Spots auf dem Autoradiogramm an der Stelle, wo tRNA^{Val} (→) identifiziert werden konnte (Dingermann 1980), andere Pfeile (→) indizieren tRNA^{Asn} und kleine Pfeile (→) tRNA^{His} .

6.2.1.4.2. Hybridisation von pDDt 2 gegen genomische *Dictyostelium discoideum* DNA

Genomische DNA wurde mit Hind III und in einem Parallelansatz mit Eco R I verdaut, nach Größe auf einem 0,7 % igen Agarosegel getrennt und auf Nitrocellulosefilter überführt. Gegen diese DNA wurden sowohl das radioaktiv markierte 2000 bp Hind III Fragment aus pDDt 2, als auch die markierten Hind III/Bam H I Fragmente (800 bp bzw. 1200 bp) hybridisiert. Auf den identischen Autoradiogrammen der Hybridisation mit dem 2 kb und der Hybridisation mit dem 800 bp Hind III/Bam H I Fragment konnten 13 deutliche Banden identifiziert werden. Mindestens 5 dieser Banden stimmen mit denen überein, die man erhält, wenn man als Probe tRNA^{Asn} verwendet (vgl. 6.2.1.1.). Es befindet sich auf diesem Fragment also eine Sequenz, die hinreichend homolog ist, um mit tRNA^{Asn} -Genen oder dafür spezifischen

flankierenden Sequenzen zu hybridisieren. Mindestens sieben der restlichen Banden indizieren somit Fragmente, die eine zum tRNA^{Val}_{GUU}-Gen ausreichende Homologie haben - reiterierte tRNA^{Val}-Gene.

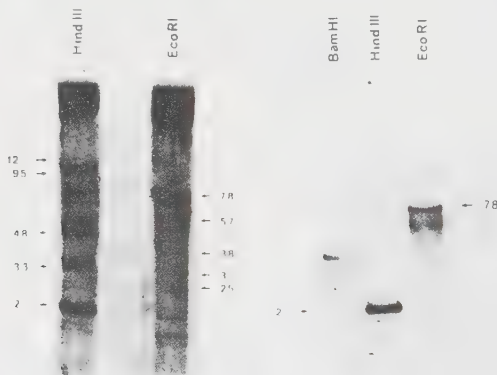


Abb. 34

Hybridisation der klonierten *D. discoideum*-DNA-Fragmente gegen genomische *D. discoideum*-DNA. Genomische *D. discoideum*-DNA wurde mit Eco R I, Hind III und Bam H I verdaut und auf einem 0,5%igen Agarosegel getrennt. Nach Southern blotting wurden gegen diese DNA das 1200 bp Hind III/Bam H I-Fragment (rechter Teil der Abbildung) und das 800 bp Hind III/Bam H I-Fragment (linker Teil der Abbildung) hybridisiert. Fragmente, die auch mit tRNA^{Asn} hybridisieren sind markiert. Das Hybridisationsergebnis des 2000 bp Fragments ist mit dem des 800 bp Fragments identisch (nicht gezeigt).

Die Analyse mit dem ³²P-markierten 1200 bp Bam H I/Hind III-Fragment ergab, daß sich darauf kein tRNA-Gen, d. h. keine reiterierte Sequenz befindet, da nur je ein Signal pro Verdau beobachtet wurde. Dieses bandierte in der Höhe von 2000 bp beim Hind III-Verdau der genomischen DNA und in der Höhe von ca. 7800 bp beim Eco R I-Verdau der genomischen DNA.

6.2.1.5. In vitro-Transkriptions-Experimente

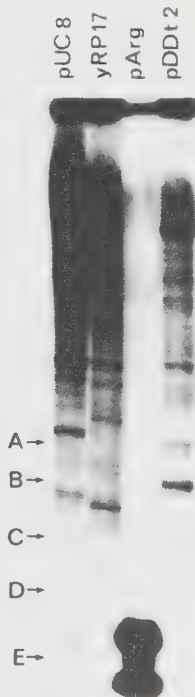
6.2.1.5.1. In vitro-Transkription des Plasmids pDDt 2 in einem *X. laevis*-Extrakt

Diese Versuche sollten abklären, ob Abschnitte auf dem Plasmid pDDt 2, die für das Pseudogen und das tRNA^{Val}_{GUU} codieren, von RNA-Polymerase III aktiv in vitro transkribiert werden. Ein Kernextrakt aus *X. laevis*-Keimzellen wurde nach dem Protokoll von Schmidt et al. (1978)

hergestellt. Trägt man nach Beendigung der Transkription die Reaktionsprodukte auf ein PAA-Gel auf, so lassen sich dabei die Transkriptionsprodukte trennen (Abb. 35). Das Hauptprodukt (etwa 150 Nukleotide) ist jedoch deutlich länger als man es für die tRNA^{Val} entsprechend ihrer Sequenz erwarten würde. Dieses Hauptprodukt entspricht in etwa der Länge eines unprozessierten Cotranskripts des Pseudo- und des Valin-Gens. Weitere Banden entsprechen einem schon 5'-prozessierten Cotranskript (etwa 130 Nukleotide), einem fertig prozessierten Pseudo-tRNA His-Transkript (etwa 90 Nukleotide) sowie einem maturen tRNA^{Val}-Transkript (77 Nukleotide). Eine weitere Bande, die einem etwa 110 Nukleotide langen Transkript entspricht, läßt sich nicht interpretieren; in diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, daß Sequenzen, die nach allgemeiner Auffassung (Ciliberto 1982, Galli 1981, Hofstetter 1981, Sharp 1982), in dem Bereich der geninternen Promotoren von tRNA-Genen vorkommen, auch auf dem "nicht codierenden Strang" vorhanden sind. Diese könnten - wahrscheinlich als Artefakt aufgrund des heterologen Systems - ein Transkriptionsprodukt der entsprechenden Größe bedingen.

Abb. 35

Autoradiogramm von in vitro Transkriptionsansätzen mit GV-Extrakt. Plamid-DNA wurde in Gegenwart von ATP, CTP, UTP und ³²p-GTP transkribiert. Transkriptionsprodukte wurden auf PAA-Gelen fraktioniert. Negative Kontrollen sind pUC 8 und yRP 17. Als positive Kontrolle wurde pArg verwendet: Ein 508 bp Drosophila-Fragment, das in die Hind III-Schnittstelle von pBR 322 kloniert ist (Silverman et al. 1979), und das für ein tRNA^{Arg}-Gen codiert. A, B, C, D und E bezeichnen Transkriptionsprodukte, die dem tRNA-Gen von pDDt 2 zugeordnet werden.



Eine Erklärung für das Auftreten der übergroßen Primärtranskripte könnte darin zu suchen sein, daß *X. laevis* RNA-Polymerase III primär nicht die interne Promotorregion des tRNA^{Val} erkennt, sondern ein Promotorsignal innerhalb des Pseudo tRNA-Gens.

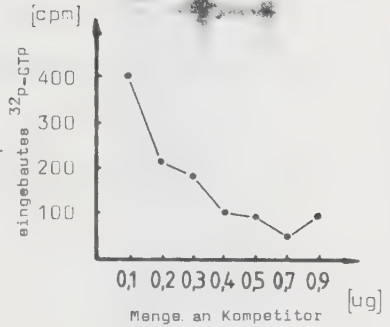
6.2.1.5.2. In vitro Transkriptions Versuche von pDDt 2 in Hela-Zellextrakten

Während in *Xenopus* Oocytenextrakt das Plasmid pDDt 2 als "template" für RNA Polymerase III katalysierte Transkription dienen kann, ist dies in einem Hela-Zellextrakt nicht möglich. Dennoch wird das, wie im obigen Transkriptionsansatz, als Positivkontrolle verwendete Plasmid pArg, das für eine tRNA^{Arg} von *Drosophila melanogaster* codiert (Silvermann et al. 1979), sehr effizient transkribiert.

Um festzustellen, ob die auf dem Plasmid enthaltenen Dictyostelium discoideum-Sequenz auch für Hela RNA-Polymerase III erkennbare Promotorsequenzen enthält, wurden Transkriptions-Kompetitions-Experimente durchgeführt. Beobachtungen diverser Autoren (Dingermann et al. 1983, Schaack et al., 1983, Sharp et al. 1983, Klemenz et al. 1982, Allison et al. 1983) deuten darauf hin, daß eine stabile Bindung von Transkriptionsfaktoren an Bereiche interner Promotoren eine Voraussetzung für die Bildung eines Transkriptions-Produkts sind. Diese Faktoren liegen in einem Transkriptions-Extrakt in limitierender Menge vor, so daß Moleküle, die entsprechende Voraussetzungen aufweisen, darum konkurrieren müssen, unabhängig davon, ob sie dann auch transkribiert werden oder nicht. Zusätze unterschiedlicher Mengen des Dictyostelium discoideum "templates" zu Hela-Zellextrakt-gesteuerten Transkriptionsansätzen, die mit konstanten Mengen an pArg "gestartet" wurden, zeigten, daß tatsächlich stabile Transkriptions-Komplexe geformt werden, da die Menge an pArg-Transkriptions-Produkten in dem Maße sinkt, wie die pDDt 2 Konzentration im Ansatz steigt.

Abb. 36

Graphische Darstellung der Auswertung eines Transkriptions-Kompetitions-Experiments. Das Experiment wurde wie unter M 3.10 beschrieben durchgeführt. Die Produkte wurden mittels PAGE fraktioniert und die entsprechenden Banden anhand des Autoradiogramms ausgeschnitten und nach Cerenkov gezählt. Diese Werte wurden gegen die Menge an pDDT 2 als Kompetitor aufgetragen.



Daraus ergibt sich jedoch noch nicht, welche Promotorbereiche - die des Pseudogens oder die des tRNA^{Val}-Gens oder eine Kombination von beiden - für diesen Effekt verantwortlich sind.

Ein tRNA^{Trp} Gen von Dictyostelium discoideum, das fast dieselben Promotor-Elemente wie das tRNA^{Val}-Gen enthält (Peffley, Sogin 1981) und das auch nicht im Hela-Extrakt transkribierbar ist, bildet unter den gleichen Bedingungen keinen stabilen Transkriptions-Komplex, wie Versuche an unserem Arbeitskreis (Dingermann persönliche Mitteilung) zeigten.

8

23

52

60

1.	T P n Q n n P P n . G G n . . A n n P	G T T C P A n n C
2.	T G G T G T A G T C G G T T . A T C A	G T T C G A T T C
3.	T A G C A T A G T . G G T T T A T T G	G T T C A A C T C

Abb. 37

Vergleich der geninternen Promotorsequenzen
 1. Allgemeine Konsensus-Sequenz 2. tRNA^{Val}_{GUU}

3. tRNA^{Trp}

Außer kleinen Unterschieden in der Sequenz der Promotorregion unterscheiden sich beide Gene hauptsächlich durch die Tatsache, daß das tRNA^{Trp} Gen eine "intervening sequence" enthält (eine eingeschobene Sequenz, die beim Prozessieren zur fertigen tRNA herausgeschnitten wird - Intron) und

natürlich eine andere 5'-flankierende Sequenz.

6.3. Untersuchungen an einem tRNA^{Val}_{GUA}-Gen

6.3.1. Reklonierung von Fragmenten des Plasmids pDT 206

Von Sogin (National Jewish Hospital and Research Center, 3800 Colfax Avenue, Denver) stammte ein Plasmid - pDT 206 -, das ein 2500 bp langes Eco R I Fragment genomischer Dictyostelium discoideum DNA enthielt und von dem bekannt war, daß es Sequenzen enthielt, die einer unbekannten Dictyostelium tRNA komplementär sind. Dieses Plasmid wurde mit Eco R I verdaut und das so erhaltene Fragment gelelektrophoretisch gereinigt. Eine anschließende Analyse mit verschiedenen REN zeigte, daß das auf dem Plasmid codierte tRNA-Gen auf einem relativ kurzen (180 bp) Hinf I-Fragment lokalisiert ist. Aus 40 ug Plasmid-DNA wurde daraufhin präparativ das 2500 bp Eco R I-Fragment isoliert und anschließend mit Hinf I verdaut. Nach Trennung der Fragmente über PAA-Gelelektrophorese wurde das kleinste Fragment mit DNA-Polymerase (Klenow-Fragment) und den 4 Desoxytrinukleotiden behandelt, um "stumpfe" Enden zu erzeugen. Der Vektor M 13 mp 8 (RF-DNA) (5 ug) wurde nun mit Hinc II geschnitten (Hinc II erzeugt stumpfe Enden) und dephosphoryliert. Der so behandelte Vektor und das Fragment wurden gemeinsam "phenolisiert" und mit Ethanol präcipitiert. Danach wurde eine Ligation durchgeführt, und der gesamte Ligationsansatz zur Transformation von JM 103 verwendet. Es wurden 4 Phagen erhalten, die ein Insert enthielten, einer davon - mp 8/Val 1.4 - wurde für weitere Untersuchungen verwendet.

6.3.2. Sequenzierung des 180 bp Hinf I-Fragments von Dictyostelium discoideum

Von dem Phagen mp 8/Val 1.4 wurde "single strand"-DNA hergestellt und zur Sequenzierung nach Sanger (5.5.1.) verwendet. Die Primärsequenz lautet wie in den Abbildungen 38, 39 angegeben.

Die so ermittelte Sequenz stimmt mit der von Sogin nach Maxam und Gilbert (1977) ermittelten völlig überein.

Etwa 30 Nukleotide nach der Hinf I-Schnittstelle beginnt das Gen, das vom Anticodon her (TAC auf dem nicht codierenden Strang) für eine tRNA^{Val}_{GUA} codiert.

Das Gen ist 74 Nukleotide lang und enthält alle konservierten und semikonservierten Nukleotide, die für eukaryotische tRNAs bekannt sind (Sprinzl, Gauss 1984). Ein CCA-Ende wird nicht codiert, wie bei höheren Organismen üblich. Die Bereiche des D-Loops und D-Stamms und des T-Loops erfüllen alle Bedingungen, soweit sie bisher für geninterne Promotoren eukaryotischer tRNAs definiert sind (Ciliberto 1982, Galli 1981, Hofstetter et al. 1981, Sharp et al 1981a). Das Gen ist mit dem oben beschriebenen Gen für tRNA^{Val}_{GUU} zu 77 % homolog. (Abb. 40)

Besonders ist zu beachten, daß die Homologie im Bereich des D-Loops, einem der beiden Promotorblöcke (N₈-N₂₇), 100 % beträgt, und die beiden Gene im Bereich des T-Loops nur in einer Base unterschiedlich sind.

A C G T

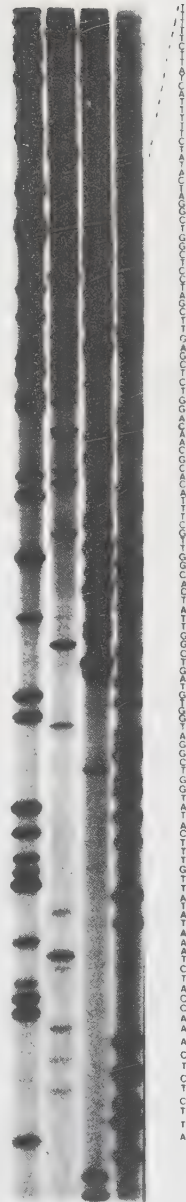


Abb. 38

Photo des Autoradiogramme des Sequenzgels des 180 bp langen Hinf I-Fragments aus mp 8/Val 1.4.

-30 -20 -10 1 10 20 30 40

GATTCTCTCAAAACATCTAAATATATGTTTCATATGGTCGGATGGTGTAGTCGGTTATCACGGTTTACACGCAAC

50 60 70 80 90 100 110 120

AGGTCCTCGAGTTCGATCCTCGGCCGGATCATATCTTTTACTATTCTTTTCCCTCTATCTATCTTTTTTTGTTCTCTC

130 140

AGAAGTTTGTATCGATTTC

Abb. 39

Primärsequenz des 180 bp langen Hinf I-Fragments aus mp 8/Val 1.4.

Promotor(Konsensus) GTTCTANNC

tRNA^{Val}_{GUU} GTTCGATTTC

tRNA^{Val}_{GUA} GTTCGATCC

Außer diesem Unterschied an Base 60 und dem unterschiedlichen Anticodon (N_{34}) finden sich alle weiteren Unterschiede im Bereich basengepaarter Regionen: dem Acceptorstamm (4) dem T-Stamm (5) und dem Anticodon-Stamm (6). Es ist anzunehmen, daß die Transkription - wie allgemein üblich - an einer Folge von T-Nucleotiden auf dem nicht codierenden Strang stoppt. Dieses Signal (T-stretch) ist hier wie im Fall des tRNA^{Val}_{GUU}-Gens verdoppelt und besteht aus zweimal je 5 Thymidin-Nukleotiden (4 Nukleotide bzw. 16 Nukleotide 3' vom tRNA-Gen).



Vergleich der Modelle der möglichen Sekundärstrukturen der beiden tRNA^{Val}-Gene.

6.3.3.1. Bestimmung der Kopienzahl des tRNA^{Val}_{GUA}-Gens auf dem haploiden Dictyostelium discoideum-Genom

Zwei Proben boten sich zu diesem Zweck zu Hybridisierung an: das kurze Hinf I-Fragment, das fast ausschließlich das tRNA-Gen enthielt, und das 2500 bp Eco R I-Fragment, das zusätzlich noch weitere Bereiche 5' und 3'-flankierender Sequenz enthielt. Beide Proben wurden mit α -³²P-dATP radioaktiv markiert und zur Hybridisation gegen genomische Dictyostelium discoideum-DNA verwendet, die mit Hind III bzw. Eco R I geschnitten und nach Größenfraktionierung auf die Cellulose-Filter geblottet worden war.

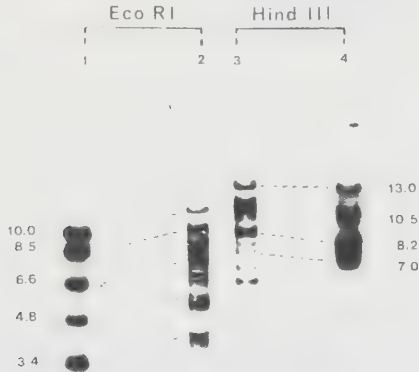


Abb. 41

Hybridisierung des Hinf I-Fragments (180 bp) gegen Eco R I (1) bzw. Hind III (4) und des 2500 bp langen Eco R I-Fragments gegen mit Eco R I (2) bzw. Hind III (3) geschnittene genomische DNA. Auf dem Autoradiogramm sind die Größen der Fragmente, die die 5 identifizierten Valin-Gene enthalten, angegeben.

Dabei wurden fünf Banden auf dem Eco R I-Verdau durch das tRNA^{Val}_{GUA}-Gen auf dem Hinf I-Fragment markiert und vier auf dem Hind III-Verdau genomischer Dictyostelium discoideum-DNA. Daraus läßt sich ableiten, daß auf dem Genom von Dictyostelium discoideum mindestens fünf Kopien des tRNA^{Val}_{GUA}-Gens lokalisiert sind, was deutlich unter der Kopienzahl des tRNA^{Val}_{GUU}-Gens liegt. Man kann also davon ausgehen, daß Dictyostelium discoideum mindestens 15 Gene für tRNA^{Val} besitzt, denn die durch tRNA^{Val}_{GUU} und tRNA^{Val}_{GUA} markierten Fragmente der jeweils mit Hind III bzw. Eco R I verdauten genomischen DNAs sind von ihrer Größe her gut diskriminierbar. Bei der Hybridisation mit dem wesentlich größeren Eco R I-Fragment (auf pDT 206) wurden mehr als 20

Signale erhalten (vgl. Abb. 45). Da man auch mit dem 800 bp Hind III/Bam H I-Fragment von *Dictyostelium discoideum*, das das Pseudogen und das tRNA^{Val}_{GUU}-Gen enthält, wesentlich mehr als die durch das tRNA^{Val}_{GUU} alleine (s.o.) markierten Banden erhält (vgl. Abb. 35), muß davon ausgegangen werden, daß beide Valin-Gene mit mittelrepetitiven DNA-Elementen assoziiert sind. Ein ähnlicher Befund wurde unlängst für ein tRNA^{Trp} Gen erhalten (Peffley, Sogin 1981).

6.3.3.2. Hybridisierung von mp 8/Val 1.4 gegen Gesamt-tRNA von *Dictyostelium discoideum*

Dieser Versuch wurde analog zu der unter 5.2.1.4.1. beschriebenen Hybridisation von pDDt 2 gegen bulk-tRNA durchgeführt. Er sollte darüber Aufschluß geben, ob tRNAs, komplementär zu den hier beschriebenen tRNA^{Val}-Genen in vivo von *Dictyostelium discoideum* exprimiert werden, und ob die Transkriptionsprodukte voneinander diskriminierbar sind. Dazu wurde zweimal je 1 A₂₆₀ bulk-tRNA unter identischen Bedingungen zweidimensional gelelektrophoretisch getrennt und auf eine Hybridisationsmembran (gene-screen) elektrophoretisch übertragen. Diese Membran wurde mit radioaktiv markierten Proben von mp8/Val 1.4 und pDDt 2 hybridisiert. Danach sind eine größere und zwei kleinere tRNA-Spezies ausreichend homolog zu pDDt 2, jedoch nur zwei tRNA-Spezies hybridisieren gegen mp 8/Val 1.4. Diese beiden tRNAs könnten identisch sein mit den beiden schwächeren Signalen der Hybridisation von pDDt 2. Auch wenn also eine schwache Cross-Hybridisierung vorliegen mag, so sind doch die Transkriptionsprodukte der beiden Gene deutlich unterschiedlich in ihrem Laufverhalten. Es lassen sich nicht unbedingt quantitative Rückschlüsse aus den Hybridisationsexperimenten ziehen, da die Proben nicht in gleicher spezifischen Aktivität vorlagen. Vergleicht man jedoch die entsprechenden Spots auf den mit Ethidiumbromid markierten Gelen, so scheinen die Genprodukte unterschiedlich stark repräsentiert zu sein. Man kann also zusammenfassen: Zumindest einige der Kopien der beiden tRNA^{Val}-Gene werden von *Dictyostelium discoideum* in vivo exprimiert. Produkte des tRNA^{Val}_{GUU}-Gens scheinen jedoch häufiger in der Population von Gesamt-tRNA von *Dictyostelium discoideum* repräsentiert zu sein.

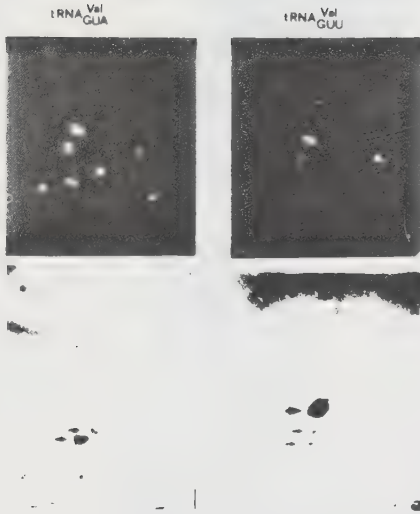


Abb. 42

Vergleichende Hybridisation von DNA-Fragmenten, die jeweils eines der beiden Valin-Gene enthielten gegen Gesamt-DNA von *D. discoideum*. Die beiden oberen Teile der Abbildung zeigen mit Ethidiumbromid angefarbte zweidimensionale PAA-Gele, die unteren Teile die jeweiligen Autoradiogramme. Wie die Pfeile andeuten, findet nur eine schwache Crosshybridisierung statt.

Präpariert man tRNA aus verschiedenen Stadien der Entwicklung von *Dictyostelium discoideum*, so zeigt sich, daß die tRNA^{Val}_{GUA} zu allen Zeitpunkten vorliegt.

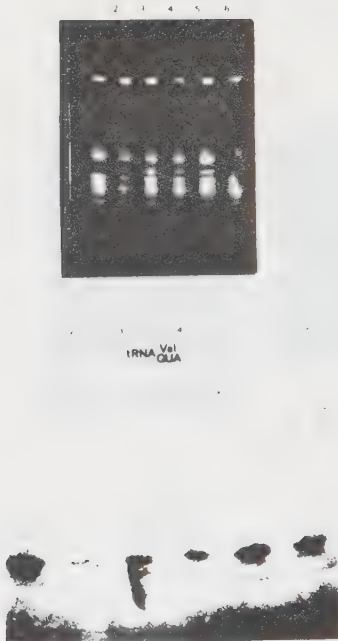


Abb. 43

Präparationen von tRNAs aus verschiedenen Stadien der Entwicklung von *D. discoideum* zeigen, daß das tRNA^{Val}_{GUA} fortlaufend exprimiert wird.

6.3.4. In vitro Transkriptions Experimente

6.3.4.1. Transkription in *X.laevis* Oocytenextrakt

Das Plasmid pDT 206 diente als Transkriptionsvorlage für RNA-Polymerase III-Extrakt aus *X.laevis*-Keimzellen. Nach Beendigung der Transkription (60 min) wurden die Reaktionsprodukte auf einem PAA-Gel getrennt.

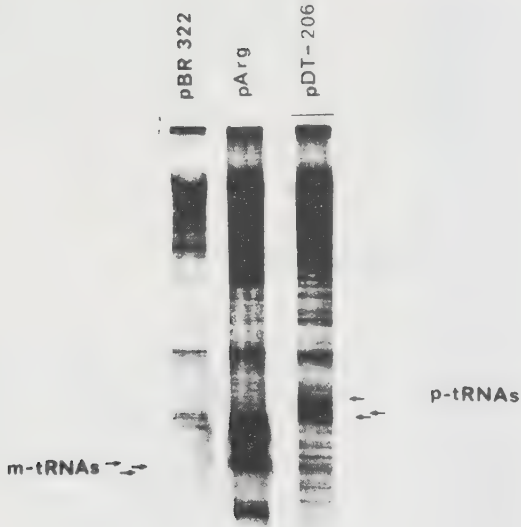


Abb. 44

In vitro Transkription von pDT 206. Auf dem Autoradiogramm sind Banden, die auf Transkription von tRNA-Genen (mature bzw. prä-mature tRNAs) zurückzuführen sind, mit Pfeilen markiert. Als Positivkontrolle ist wiederum pArg mitgeführt (vergl. Abb. 37).

Übergroße Transkriptionsprodukte, wie bei der Transkription von pDDt 2 können hier nicht beobachtet werden. Die Größe der identifizierbaren Produkte liegt bei 114 bp (premature tRNA) und 97 bp und 76 bp.

6.3.4.2. In vitro Transkription in Hela-Zellextrakten

Versuche mit Hela-Zellextrakt (Weil et al. 1979) zeigten unter unseren Bedingungen keine RNA-Polymerase III abhängige Transkription des Plasmids pDT 206, analog zu dem Ergebnis des Transkriptionsversuchs von pDDt 2 (6.2.1.5.2.). Um festzustellen, ob auch auf diesem Plasmid eine DNA-Sequenz vorhanden ist, die für Hela RNA-Polymerase III erkennbare Promotorsequenzen

enthält, wurden auch hier wieder Transkriptions-Kompetitions-Experimente durchgeführt. Zusätze unterschiedlicher Mengen von DNA-Vorlagen zu Hela-Zellextrakten gesteuerten Transkriptionsansätzen, die wieder mit konstanter Menge an pArg (Silvermann et al. 1979) "gestartet" wurden, zeigten jedoch, daß das Plasmid pDT 206 nicht zu einer stabilen Transkriptions-Komplex-Bildung in der Lage ist im Gegensatz zu pDTt 2.

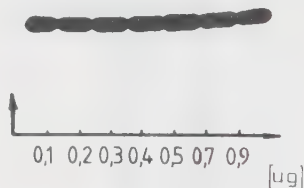


Abb. 45

Transkriptions-Kompetitionsversuche des $\text{tRNA}_{\text{GUU}}^{\text{Val}}$ -Gene in einem Hela-Zellextrakt. Die Versuchsdurchführung war analog 1.5.2. (Vergl. Abb. 38).

6.4. Transkriptionstests der beiden tRNA^{Val} -Gene

6.4.1. Vergleich der Transkriptionsrate der beiden tRNA^{Val} -Gene

Ein funktioneller Unterschied zwischen den beiden isolierten tRNA^{Val} -Genen sollte sich auch in einem unterschiedlichen in vitro Transkriptionsverhalten zeigen. Wie unter 6.3.4.2. und 6.2.1.5.2. gezeigt, transkribieren beide nicht in einem Hela-Zellextrakt, das $\text{tRNA}_{\text{GUU}}^{\text{Val}}$ -Gen bildet allerdings mit Transkriptionsfaktoren einen stabilen Komplex (Kompetition), das $\text{tRNA}_{\text{GUA}}^{\text{Val}}$ -Gen jedoch nicht. Transkribiert man die entsprechenden Plasmide (pDDt 2 bzw. pDT 206) in einem *X. laevis* Extrakt unter identischen Bedingungen (5.3.10.), so zeigen sich auch hier Unterschiede. pDDt 2 transkribiert deutlich besser als pDT 206.

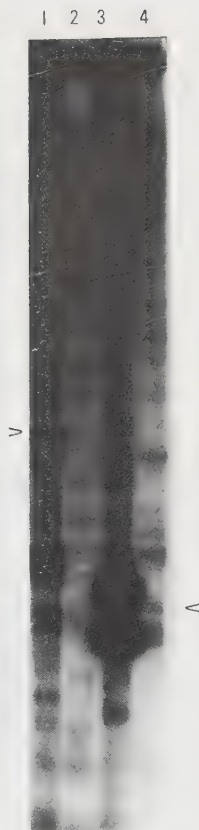


Abb. 46

Vergleich der in vitro Transkription der beiden tRNA^{Val}-Gene. Die Banden der spezifischen Haupttranskriptionsprodukte sind markiert. Das Plasmid pDDt 2 transkribiert deutlich besser als das Plasmid pDT 206. Reihe 1 zeigt die Transkription mit pDDt 2, Reihe 2 die mit pUC-8 als Leerwert, Reihe 3 die mit pArg als Referenz und Reihe 4 die mit pDT 206.

6.4.2. Untersuchungen zum Einfluß der tRNA-Konzentration zur Transkriptionsrate

Identischen Transkriptionsansätzen mit pDDt 2, dem Plasmid, das das tRNA^{Val}-Gen enthält, wurden unterschiedliche Mengen an Gesamt-tRNA zugesetzt (50 µg, 5 µg, 500 ng, 50 ng, 5 ng sowie kein tRNA-Zusatz). Die Transkriptionsprodukte wurden auf einem PAA-Gel getrennt, die Banden mit spezifischen Transkriptionsprodukten entsprechend der Fluorographie ausgeschnitten und gezählt.



Abb. 47

Einfluß der tRNA Menge/Transkriptionsansatz auf die Transkriptionsrate. Identischen Ansätzen wurden unterschiedliche Mengen an tRNA (50 ug, 5 ug, 500 ng, 5 ng und ohne Zusatz) zugesetzt. Die entsprechenden Bahnen wurden mit a, b, c, d, e und f bezeichnet. Die Produkte wurden gelelektrophoretisch getrennt und zur Fluorographie aufgelegt. < bezeichnet die Bande des Haupttranskriptionsprodukts.

Sehr große Mengen an tRNA (2 umol in einem Ansatz mit 0.116 pmol Plasmid DNA) hemmen die Transkription fast vollständig, kleine Mengen (200 pmol in einem Ansatz mit 0.116 pmol haben einen fördernden Einfluß. Es zeigt sich eine logarithmische Abhängigkeit der Transkriptionsrate von der tRNA-Konzentration.

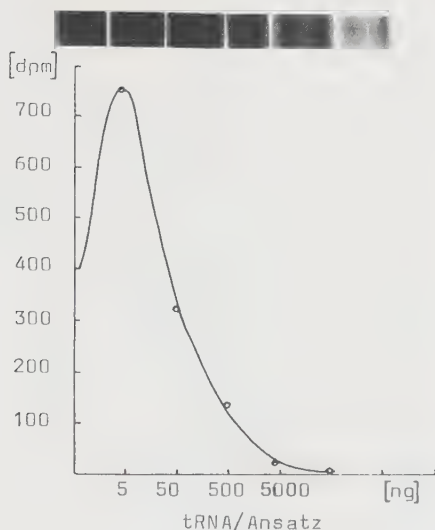


Abb. 48

Abhängigkeit der Transkriptionsrate von der tRNA-Konzentration. Entsprechend dem Fluorogramm wurden aus dem aufgetrockneten Gel die Hauptprodukte des transkribierten tRNA^{Val}-Gens ausgeschnitten und gezählt. Es zeigte sich, daß die für die Transkription förderliche tRNA-Konzentration bei etwa 5 ng/Ansatz (0.5 µg Plasmid DNA) liegt.

6.5. Vergleich 5'-flankierender Sequenzen

Im Rahmen dieser Arbeit sollten auch die Einflüsse unterschiedlicher 5'-flankierenden Sequenzen auf die Transkription untersucht werden. Als ein Ansatz dazu wurde auch die Suche nach Übereinstimmungen zwischen den 5'-flankierenden Sequenzen von tRNA-Genen aus verschiedenen Organismen angesehen. Dazu wurden einige, nicht ausgewählte, in der Literatur beschriebene Sequenzen und natürlich auch die hier erarbeiteten miteinander verglichen. Dabei wurden mehrere frappante Übereinstimmungen in einem Bereich von etwa 20 Nukleotiden um das Nukleotid - 36 herum entdeckt. Schon wiederholt wurde von einigen Autoren beschränkte Homologie innerhalb des gleichen Organismus oder Isoacceptors erkannt (DeFranco 1981, Indik, Tartof 1982).

6.5.1. ACTGA

Wie aus Abb. 50 hervorgeht, befindet sich um das Nukleotid -36 herum ein Bereich, in dem die Sequenz ACTGA relativ hoch konserviert ist.

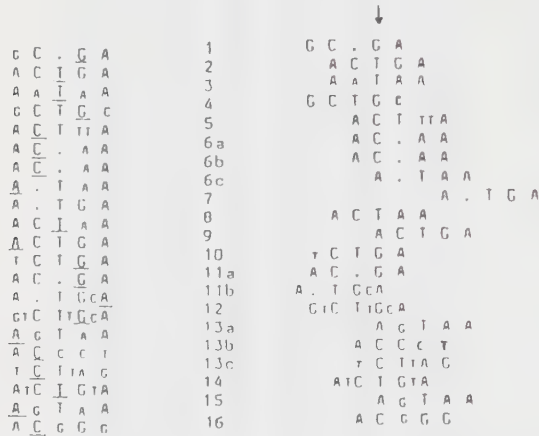


Abb 49

Sequenzbereiche um das Nukleotid -36 vor tRNA-Strukturgenen. Im linken Teil sind die Sequenzen so angeordnet, daß ein maximaler Konsensus vorliegt (N -36 unterstrichen), im rechten Teil sind sie so angeordnet, daß unter dem Pfeil jeweils das Nukleotid -36 liegt. Die mittlere Zahlenkolonne repräsentiert Literaturreferenzen, die auf Seite 104 erläutert werden.

6.5.2. TAAAT

Aus Abb. 51 a,b ergibt sich, daß 5' der ACTGA-Box (nicht mehr als 15 Nukleotide entfernt, ("upstream")) ein Bereich vorhanden ist, in dem eine "repeated" Sequenz auftritt. Diese ist 4-6 Nukleotide lang und besteht entweder aus einer direkten Wiederholung oder einer Wiederholung, die komplementär zur vorausgegangenen Sequenz ist. Darüber hinaus überlappt mit diesem Sequenzbereich ein DNA-Abschnitt, in dem die Basenfolge PyPu₄Py hochkonserviert ist. Da in den hier sequenzierten und in einigen anderen tRNAs die Basenfolge TAAAT überwiegt, wird sie TAAAT-Box genannt.

a)

→ →	1	TCTCTT <u>I</u> AAAA <u>T</u> ICCGA <u>T</u> TCTCT
→ →	2	GAAACT <u>I</u> GGGAC <u>T</u> CAAA <u>C</u>
	3	AA <u>T</u> AAGAC <u>T</u> TTATAT <u>T</u>
→ →	4	GTGT <u>A</u> IAAAA <u>T</u> GGCTGCTTAC <u>C</u> AAAG <u>I</u> CT
	5	GTAA <u>C</u> A <u>C</u> TTTAC
→ →	6a	ACAA <u>C</u> A <u>C</u> AA <u>C</u>
→ →	6b	A <u>C</u> AAAACTAC <u>C</u> AAAT
→ →	6c	CTTAC <u>A</u> IGGCTT <u>A</u>
	7	AGT <u>T</u> GCATGA <u>C</u> T
→ →	8	AC <u>T</u> AAACTA
→ →	9	TTTATATAT <u>C</u> ACAAT <u>T</u> A
	10	CTT <u>T</u> GA <u>C</u> AGAA <u>G</u> AAG
	11a	GGACCGTAG <u>C</u> AAAA <u>G</u> TCC...
	11b	CATAT <u>A</u> BAATG...
→ →	12	CT <u>T</u> GCAGCTTCATATCCTTG
→ →	13a	AATGT <u>C</u> AGTAATCT
→ →	13b	TA <u>T</u> AGAGAA <u>C</u> CCCTTATA
	13c	TCCTTACTTCTAGTCT <u>T</u> AGGAG
	14	ATGGTACCT <u>C</u> ACAACCAT..
	15	AT <u>T</u> AGTAA <u>T</u>
	16	<u>I</u> AAAA <u>C</u> GGGTATCAGTTATTTA

b)

		T A A A A T
		O P P P P Q
1		T A A A A T
2		T G G G A C
3		T A A G A C
4		T A A A A T
5		T A A C A C
6a		C A C A A C
6b		C A A A A T
6c		C A T G G C
7		T G A A . C
8		T A A A . C
9		C A C A A T
10		C A G A A G
11a		C A A A A G T
11b		T A A A . T
12		T G C A G C
13a		C A G T A A T
13b		T A G A C A C
13c		T A C G A G A C
14		C A C A A C
15		T A G T A A T
16		T A A A A C

Abb. 50a, b

- a) 5'-flankierende Sequenz von tRNA-Genen im Bereich von "repeats" (→ direkte, || indirekt komplementäre "repeats"). Das Nukleotid -36 ist mit einem x markiert, der Bereich der TAAAT ist unterstrichen.
- b) Die TAAAT-Box in 5'-flankierenden Sequenzen von tRNA-Genen. Die Sequenzen sind so angeordnet, daß immer maximale Übereinstimmung mit der in den ersten beiden Zeilen der Abbildung angegebenen Konsensus-Sequenz vorliegt.

Die Zahlenkolonnen repräsentieren Literaturreferenzen, die auf Seite 104 erläutert werden.

Die in den drei vorausgegangenen und der 4. noch folgenden Abbildung verwendeten Referenznummern beziehen sich jeweils auf folgenden Literaturstellen:

1. Dictyostelium discoideum tRNA^{Val}_{GUU}: Diese Arbeit
2. Indik, Tartof 1982 tRNA^{Glu}, Drosophila
3. Larson et al. 1983 tRNA^{Ala}, Bombyx
4. Peffley, Sogin 1981 tRNA^{Trp}, Dictyostelium
5. Lamond, Travers 1983 tRNA^{Tyr}, E.coli
6. delRey et al. 1983 tRNA^{His}, tRNA^{His}, tRNA^{His}, Hefe
7. Hudson et al. 1981 tRNA^{Thr}, E.coli
8. Kryukov et al. 1983 tRNA^{Ser}, T₄-Phage
9. Clary et al. 1983 tRNA^{Gly}, Drosophila mitoch.
10. Goddard et al. 1983 tRNA^{Glu}, Mensch
11. Hu et al. 1983 tRNA^{Pro}, tRNA^{Gly}, Maus
12. Hatfield et al. 1983 tRNA^{Ser}(opal), Huhn
13. Roy et al. 1982 tRNA^{Lys}, tRNA^{Gln}, tRNA^{Leu}, Mensch
14. Sharp et al. 1981b tRNA^{Met}, Drosophila
15. Villanueva et al. 1984 tRNA^{Arg}, Hefe
16. Dictyostelium discoideum tRNA^{Val}_{GUA}: Diese Arbeit

6.5.3. Vergleich zwischen Strukturgenen und 5'-flankierenden Sequenzen

Die Bereiche der direkten und indirekten komplementären Wiederholungen sowie der "TAAAAT-Box", wurden in den Fällen, wo die Sequenz des dazugehörigen Strukturgens bekannt war, mit diesem verglichen. Dabei ergab sich in allen Fällen (18 untersuchte) eine Homologie zu jeweils einem Teil des codierenden Bereichs der tRNA, meist des T-Loops (um das Nukleotid 53) und des Antidicon-Bereichs (um das Nukleotid 30) aber auch des D-Loops und des Extraarms. Oft ist die Komplementarität im Bereich der TAAAAT-Box unvollkommen. Einige dieser 5'-flankierenden Sequenzen sind zu sich selbst komplementär (über mindestens 4 (6 Fälle) aber auch 5 (3 Fälle) und 6 Basen (1 Fall)) und lassen sich zu einer "stem-loop"-Sekundärstruktur falten. Ein Teil der "TAAAAT-Box" liegt dabei im Stamm- und ein anderer im Loop-Bereich. Auffällig ist, daß diese Phänomene nicht nur bei Eukaryoten (die hier zitierten Referenznummern 1,2,3,4,6,10,11,12,13,14,15, und 16) sondern auch bei Prokaryonten (Referenznummern 5 und 7) und Mitochondrien (Referenz 9) und sogar bei Phagen (Referenz 8) zu beobachten sind.

a)



b)

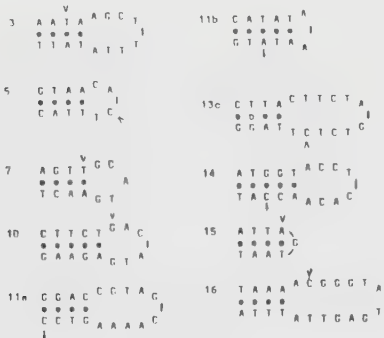


Abb. 51a, b

a) Vergleich der Komplementarität der 5'-flankierenden Sequenzen (jeweils oben der codierende Strang von 3' nach 5') und Teilen des dazugehörigen Genprodukts (5'-3') im Bereich direkter "repeats".
 b) Modelle möglicher Sekundärstrukturen einiger 5'-flankierender Sequenzen im Bereich der inversen "repeats".

- o symbolisiert potentielle schwache Wechselwirkungen
- o symbolisiert eventuelle Basenpaarungen
- V markiert das Nukleotid -36, f das Nukleotid -40 und
- C markiert das Nukleotid -32 auf dem codierenden Strang
- ^ markiert das Nukleotid +53, ^ das Nukleotid +30
- I markiert das Nukleotid +48 und " das Nukleotid +17 auf der RNA

Die Zahlenkolonnen repräsentieren Literaturreferenzen, die auf Seite 104 erläutert werden.

7. DISKUSSION

Am besten untersucht ist die Rolle von Transfer RNA und Transfer RNA-Modifikationen bei der Proteinbiosynthese. In den letzten Jahren häufen sich experimentelle Hinweise dafür, daß Transfer RNA-Modifikationen und Transfer RNA Gene eine wichtige Rolle bei der Regulation der Expression von Proteingenen - auf der Transcriptions- wie auf der Translationsebene spielen. Etwa 50 modifizierte Nukleoside wurden in Transfer RNAs gefunden. Sie treten in spezifischen tRNAs an definierten Positionen auf. Die Nukleoside werden auf der Stufe der tRNA durch spezifische Enzyme modifiziert (Nishimura 1978). Besonderes Interesse fand in den letzten Jahren ein Deazaguaninderivat, Queuosin (Q). Es kommt in den Transfer RNAs spezifisch für Tyrosin, Histidin, Asparaginsäure und Asparagin vor und zwar in der ersten Position des Anticodons ("Wobbel-Position") (Harada, Nishimura 1972). Diese Modifikation hat einige Besonderheiten.

In Eubakterien wird eine Vorstufe im Austausch gegen Guanin an Position 34 durch eine spezifische tRNA-Transglycosylase eingefügt. In höheren Organismen kann Queuin nicht synthetisiert werden. Es wird mit der Nahrung zugeführt, oder das durch die Darmflora gebildete Queuin wird aufgenommen. Der Gehalt an Queuosin in tRNAs ändert sich in Abhängigkeit von Alter und Differenzierung (Landen et al. 1979, Lin et al. 1980, Shindo-Okada et al. 1981, Übersicht: Nishimura 1983) sowie bei maligner Entartung (Okada et al. 1978, Roc et al. 1979, Singhal et al. 1981, Zubrod 1982, Kersten et al. 1984). Diese Änderungen sind bei verschiedenen Organismen beobachtet worden.

In unserem Arbeitskreis wird *Dictyostelium discoideum* als einfaches Modellsystem benutzt, um die Funktion modifizierter Nukleoside in tRNAs bei der Differenzierung aufzuklären. In *Dictyostelium discoideum* wurden zwei Hauptisoacceptoren spezifisch für tRNA^{Asn} gefunden (Palatnik et al. 1977). Palatnik und Mitarbeiter vermuteten, daß der Isoacceptor II (tRNA₂^{Asn}) Q enthält und der Isoacceptor III (tRNA₃^{Asn}) G an Position 34. Es ist bislang noch nicht bewiesen, ob beide Isoacceptoren von der gleichen Genfamilie codiert werden, was ausschließlich durch eine Sequenzanalyse der authentischen tRNAs bzw. ihrer Gene möglich ist.

Es sollte geklärt werden, ob die beiden tRNA-Isoacceptoren Unterschiede

zeigen bei der Kinetik der Aminoacylierung oder im zellfreien System der Proteinbiosynthese.

Es wurde daher zunächst untersucht, ob die Modifikation Q in tRNAs die Beladung von tRNAs durch die tRNA-Ligasen beeinflusst. Daher wurde die Kinetik ($v_{\max}$, k_m) der Aminoacylierung der beiden Hauptisoacceptoren bestimmt. Im Gegensatz zu den von Singhal, Vakharia (1983) bestimmten Werten für tRNA^{Asp} ist der $v_{\max}$ -Wert für den G-haltigen Isoacceptor der tRNA^{Asn} etwa doppelt so hoch wie für die vollmodifizierte Form. Nach Messungen von Dingermann (1980) hat der tRNA^{Asn}_Q-Synthetasekomplex eine höhere Affinität zur Aminosäure, als die nicht modifizierte tRNA^{Asn}_G. Bei Aminosäuremangel würde danach der oben genannte Effekt ($k_m Q > k_m G$) wieder wettgemacht werden. Die Unterschiede zu tRNA^{Asp} könnten darauf beruhen, daß tRNA^{Asp} aus Säugerzellen ein Mannosyl-Derivat von Q enthält (Singhal).

Enzymextrakte, die durch fraktionierte Ammonsulfatfällungen gewonnen wurden, waren z.T. inaktiv, ließen sich aber durch Kombination der getrennten Fraktionen wieder reaktivieren. Diese teilweise Inaktivierung äußert sich durch eine generell langsamere, unvollständigere Beladung, jedoch ist der Q-haltige Isoacceptor davon besonders betroffen. Auch eine Trennung der Synthetase-Komplexe auf einer Aminohexylsepharose-Säule zeigt, daß der Q-haltige Isoacceptor von den beiden erhaltenen Aktivitäten langsamer beladen wird.

Unter bestimmten Bedingungen wurden die beiden tRNA^{Asn} Isoacceptoren in einem Gesamt-tRNA Gemisch in Aminoacylierungsansätzen unterschiedlich beladen, was sich säulenchromatographisch nachweisen ließ. Bei niedrigen Enzymkonzentrationen wird der Isoacceptor III besser beladen als II, wohingegen bei höheren Enzymkonzentrationen tRNA^{Asn}₂ um ca. 20 % besser beladen ist. Noch deutlicher ist dieses Verhältnis unter der Einwirkung von O₂ zugunsten der Beladung Q-haltiger tRNA verschoben, während N₂ und BMe als Oxidationsschutz der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen keinen Einfluß zeigten.

Es war vermutet worden, daß modifizierte Nukleoside an der Regulation aerober oder anaerober Stoffwechselwege beteiligt sein könnten.

Ein Zusammenhang zwischen anaeroben Stoffwechselwegen und der Modifikation Q konnte später in unserem Arbeitskreis von Jänel et al. (1984) an E. coli gezeigt werden. Mutanten von E. coli, denen das Enzym zum Einbau der Modifikation Queuosin (bzw. der Vorstufe davon) in tRNA fehlt, können anaerob mit Lactat als Elektronendonator und Nitrat als Elektronenacceptor nicht wachsen.

Dictyostelium discoideum ist, ähnlich wie höhere Organismen auf exogene

Queuin-Zufuhr angewiesen (Ott 1984). In *Dictyostelium discoideum* führt ein Mangel an Queuosin zu Änderungen im D-Lactat-Spiegel während der Differenzierung. Die Anwesenheit von Q ist für das Auftreten eines Cytochrom b_{559} bei Nahrungsentzug von Bedeutung (Schachner et al. 1984).

In letzter Zeit konnten Unterschiede im Leseverhalten Q-defizienter und Q-haltiger tRNA festgestellt werden. So konnten Kubli und Grosjean (nicht veröffentlicht) in *Xenopus*-Oocyten-Systemen nachweisen, daß tRNA^{His} mit G an Position 34 bei der Translation von TYMV-RNA das Codon CAC bevorzugt liest, während tRNA^{His} mit Q an der Position 34 das Codon CAU gleich gut bedient. Im gleichen System zeigten Bienz und Kubli (1981), daß tRNA^{Tyr}_G ein amber Stoppcodon lesen kann, tRNA^{Tyr}_Q dagegen nicht. Eine Änderung im "codon-usage" mag zu einer veränderten Synthese-Geschwindigkeit und damit Verfügbarkeit regulatorischer und obligatorischer Proteine führen. Dies kann Auswirkungen auf die Enzymausstattung und Differenzierung eines Zellsystems haben. Ebenso können "read-through"-Produkte auftreten, die normalerweise nicht in der Zelle vorhanden sind.

Besonders durch die Arbeiten aus unserem Arbeitskreis (Schachner et al. 1984, Jänel et al. 1984) häuften sich Hinweise dafür, daß Q in tRNAs regulatorische Funktion hat und nicht primär bei der Translation des Strukturgens modulierend wirkt.

Ein sehr diffiziler Mechanismus zur Regulation der Expression von tRNA-Genen muß in der Zelle vorhanden sein, um einen koordinierten Spiegel der einzelnen tRNA-Spezies und ihrer oft sehr nahe verwandten Gen-Familien zu gewährleisten. Daher sollte die Struktur und Organisation von tRNA-Genen bei *Dictyostelium discoideum* untersucht werden.

Die tRNA-Gene von Eukaryonten (Olson et al. 1977, Aloni et al. 1977) liegen wahrscheinlich über das ganz Genom verteilt vor. Für *Xenopus* l. wurden einige Cluster gefunden (Clarkson et al. 1978).

Prokaryotische tRNA-Gene, die häufig geclustert vorkommen, können als polycistronische oder monocistronische Einheiten transkribiert und später zu den fertigen einzelnen tRNAs prozessiert werden (Rossi et al. 1980).

Die 3'-flankierenden Sequenzen von tRNA-Genen sind AT-reich und stellen Terminationssignale (Folgen von vier oder mehr T auf dem nichtcodierenden Strang) dar (Tekamp et al. 1979, Hagenbüchle et al. 1979). Bislang konnten in den 5'-flankierenden Sequenzen keine stark konservierten Bereiche identifiziert werden, die als Regulationssignale zur tRNA-Genexpression

dienen könnten, obwohl eigene Untersuchungen Gemeinsamkeiten in dieser Region zwischen verschiedenen tRNA-Genen aufzeigen (s. u.). Eine Besonderheit eukaryotischer tRNA-Gene sind ihre geninternen Promotoren (Sharp et al. 1981a, Hofstetter et al. 1981, Galli et al. 1981, Ciliberto et al. 1982). Solche Promotorbereiche finden sich auch in 5S-RNA-Genen und einigen virusassoziierten Genen (Jat, Arrand 1982, Rosa et al. 1981, Bogenhagen et al. 1980), die auch von RNA-Polymerase III transkribiert werden.

Um Untersuchungen zur Genexpression auf Transkriptionsebene durchzuführen, sollten tRNA-Gene von *Dictyostelium discoideum* isoliert werden.

Es wurden zwei Fragmente genomischer *Dictyostelium discoideum*-DNA analysiert, die beide für eine tRNA^{Val} codierten.

Ein tRNA-Gen mit dem Anticodon AAC wurde zuerst isoliert. Es stammt aus einer Genbank, die mit spezifischer tRNA^{Asn} getestet worden war. Auf dem entsprechenden Fragment befindet sich außer dem tRNA^{Val}_{GUU}-Gen noch ein Pseudogen, das zum Teil mit dem tRNA^{Val}-Gen überlappt, jedoch kein tRNA^{Asn}-Gen, obwohl dieses Fragment mit spezifischer tRNA^{Asn} selektioniert worden war. Dafür bieten sich mehrere Erklärungen an.

Es könnte eine mögliche Verunreinigung der tRNA^{Asn}-Präparation mit tRNA^{Val} vorliegen. Dagegen spricht, daß die tRNA-Präparation zu mehr als 1200 pmol/A₂₆₀ mit Asparagin jedoch nicht mit Valin beladbar war.

Eine weitere Möglichkeit wäre, daß auf dem isolierten DNA-Fragment von *Dictyostelium discoideum* ein Abschnitt liegt, der ausreichend homolog zu einer tRNA^{Asn} ist, um damit unter den hier angewandten Bedingungen zu hybridisieren. Eine solche Struktur könnte in dem schon erwähnten Pseudogen vorliegen.

AAGCTTCAATGATAGAAATTTAAACGGGTATGAGTTATTTAACATGAAAAAATATCGATTAGTTCGGATGGTGTAGTCGGTTATC

D-Promotor Anticodon T-Promotor

A-Block B-Block

Abb. 52

Primärsequenz des Pseudogens. Die den Promotorbereichen entsprechenden Sequenzen sind unterstrichen.

Es läßt sich zur typischen Kleeblattstruktur rückfalten, enthält viele für eukaryotische tRNAs bekannte invariante (87 %) und seminvariante (70 %) Nukleotide (Sprinzl, Gauss 1984) und besitzt einen relativ langen Extraarm. Einige Abweichungen von einem normalen tRNA-Gen liegen jedoch vor. Über den 5'-Teil des Acceptor-Stamms (Nukleotid 1-3) läßt sich nichts aussagen, da er aufgrund der Klonierungsstrategie (Hind III-Genbank) verstümmelt vorliegt. Im Plasmid pDDT 2 wird jedoch für Nukleotid 1 ein G vom Vektor zur Verfügung gestellt. Ferner fehlt eine Basenpaarung im Anticodon-Stamm, was jedoch nicht allzu ungewöhnlich ist. Ein ähnliche Fehlpaarung ("mismatch") ist für ein menschliches tRNA^{Glu} Gen beschrieben (Goddard et al. 1983) und tritt auch in dem oben beschriebenen tRNA^{Val}_{GUA}-Gen von Dictyostelium discoideum auf. Ungewöhnlich ist, daß der D-Stamm nur 2 Basenpaarungen aufweist, da drei bzw. vier Basenpaarungen die Regel sind. Auffallend ist auch, daß in dem langen Extraarm (13 zusätzliche Nukleotide), wie er bisher nur für tRNA^{Ser}, tRNA^{Leu} und tRNA^{Tyr} beschrieben worden ist, nur drei Basenpaarungen auftreten. Auch der ungewöhnlich große T-Loop (12 anstelle von 7 Nukleotiden) könnte die Funktion beeinträchtigen. Es fällt auf, daß G₅₃ nicht wie normal basengepaart vorliegt. Wie bei allen tRNAs ist die Position 33 von einem T besetzt und auch die Position 37 (A) ist durchaus typisch für den Anticodon-Bereich.

Die bisherige Definition der geninternen Promotoren der RNA-Polymerase III-abhängigen tRNA-Transkription (Sharp et al. 1981a, DeFranco et al. 1980, Hofstetter et al. 1981, Galli et al. 1981, Ciliberto et al. 1982) umfaßt zum einen das Nukleotid 8 mit den darauffolgenden 16 bis 19 Nukleotiden und zum anderen den Bereich der Nukleotide 53 bis 60.

8		23
I P N Q N N P P N . G G N . . A N N P		und
53		61
G T T C P A N N C		

In diesem Bereich finden sich die Nukleotide T₈, G₁₈, A₂₁, G₅₃, T₅₄, T₅₅, C₅₆ sowie die Purine in Position 14, 15 und 57. G₁₉ ist in ein A und A₅₈ in ein G umgewandelt. Das Purin in Position 9 ist nicht absolut konstant in eukaryotischen tRNAs. Es ist auch in 2 tRNA^{His} durch ein Pyrimidin ersetzt (Altweg, Kubli 1980, Boissard, Petrissant 1981). Besonders auffallend ist die Abwesenheit von Pyrimidin an Position 11 bzw. Purin an Position 24 und die Transversion von C₆₀ in T₆₀.

All das bedingt eine Übereinstimmung der Promotor-Sequenzen im A-Block von

etwa 80 % und im B-Block von etwa 90 %.

Obwohl das Anticodon dieses Gens ein Histidin-Codon erkennt ($5' \text{ATG} 3'$), würde doch ein einziger Mutationsschritt ausreichen, um ein Asparagin-Codon zu erkennen ($5' \text{ATT} 3'$). Der Selektionsdruck zur Erhaltung der ursprünglichen Sequenz ist bei einem Pseudogen wahrscheinlich für einige Bereiche des Gens geringer als bei einem regulären tRNA-Gen.

Ein weiterer Grund, der für eine große Homologie zu tRNA^{Asn}-Genen spricht, sind die Ergebnisse von Hybridisationen mit dem Fragment gegen genomische *Dictyostelium discoideum*-DNA. Mindestens 13 Banden lassen sich auf dem Autoradiogramm identifizieren. 5 davon lassen sich eindeutig denen zuordnen, die man mit tRNA^{Asn} als Probe erhält. Der Rest der auftretenden Banden ist daher auf Fragmente genomischer DNA zurückzuführen, die für tRNA^{Val} codieren.

Sowohl die Anzahl der so nachgewiesenen tRNA^{Asn}-Gene als auch die der tRNA^{Val}-Gene liegt in der für *Dictyostelium discoideum*-Gene zu erwartenden Größenordnung (Peffley, Sogin 1981).

Eine weitere Möglichkeit, mit einer tRNA^{Asn} bei der Hybridisation ein tRNA^{Val} Gen zu erhalten, ergibt sich aus der Tatsache, daß zum "screening" der Genbank mit ^{125}I -markierte tRNA verwendet wurde. Bei diesem Markierungsverfahren werden hauptsächlich C-Reste aber auch andere Basen (Tereba, McCarthy 1973) iodiert. Das mag die Stringenz dahingehend beeinflussen, daß auch das Pseudogen noch mit tRNA^{Asn} hybridisiert, aber eventuell auch, daß die so modifizierte tRNA^{Asn} in der Lage ist, gegen ein tRNA^{Val}-Gen zu hybridisieren.

Eine endgültige Aussage über diese Möglichkeit ist wohl erst möglich, wenn die Sequenz einer authentischen tRNA^{Asn} bzw. eines entsprechenden Gens bekannt ist.

Zum Vergleich wurde daher ein zweites tRNA^{Val} Gen studiert.

Dieses, ein tRNA^{Val}_{GUA} Gen, stammt aus einer Genbank, die mit Gesamt-tRNA getestet worden war. Dieses tRNA-Gen zeigt alle Eigenschaften, die man für eine typische eukaryotische tRNA erwartet. Alle invarianten und semiinvarianten Nukleotide (Sprinzl, Gauss 1984) sind vorhanden. Die Primärstruktur läßt sich in die typische Kleeblattform mit der jeweils

geforderten Anzahl der Nukleotide für die drei Loops und den entsprechenden Basenpaarungen der Stammregionen falten. Ein erwartungsgemäß kurzer Extraarm wird gefunden, jedoch kein Intron, und wie üblich ist das CCA-Ende nicht codiert. Die unter 6.5. beschriebenen Bedingungen an ein transkriptionsfähiges tRNA-Gen bezüglich der 5'-flankierenden Sequenz sind erfüllt, und auch das obligatorische Signal für die Termination der Transkription, eine oligo-dT Sequenz, (in diesem Fall zweimal eine Folge von je fünf T) findet sich 5 Basen nach der maturen tRNA-Sequenz.

Das mit dem Pseudogen assoziierte tRNA^{Val}-Gen ist mit dem anderen tRNA^{Val}-Gen zu 77 % homolog.

tRNA^{Val}_{GUU}

GTTCGGATGGTGTACTCGGTTATCACGAATCCTTAACACGGATTAGGTCGTGGGTTTCGATTCCCGCTCTGAATA

A-Block Promotor

B-Block Promotor

GGTCGGATGGTGTAGTCGGTTATCACGGTTGCTTTACACGCAACAGGTCTCGAGTTCGATCCTCGGTCGGATCA

tRNA^{Val}_{GUA}

Auffallend ist, daß nahezu alle Änderungen in den basengepaarten Bereichen liegen und, daß die Bereiche der geninternen Promotoren beinahe identisch sind. Allein das in der tRNA^{Val}_{GUA} als C vorliegende Nukleotid 59 liegt in der tRNA^{Val}_{GUU} als T vor. Die andere Änderung betrifft das Anticodon selbst. Geht man davon aus, daß ein A in Position 34 in allen bisher bekannten tRNA modifiziert ist und sehr häufig als Inosin vorliegt, so sollte die tRNA^{Val} mit dem Anticodon 5' IAC^{3'} in der Lage sein, die Codons GUU, GUC und GUA zu lesen, die tRNA mit dem Anticodon 5' UAC^{3'} die Codons GUG und GUA. Diese beiden Spezies wären dadurch in der Lage, alle möglichen Valin-Codons zu lesen, und die tRNA^{Val}_{GUA}-Spezies wäre demnach nur für das Codon GUG unabdingbar.

Es wurde festgestellt, daß von beiden tRNA^{Val}-Genen unterschiedlich viele Kopien (tRNA^{Val}_{GUA} ca. 5 Kopien, tRNA^{Val}_{GUU} ca. 10 - 15 Kopien) auf dem haploiden Genom von Dictyostelium discoideum vorliegen. Nur wenn das Codon GUG überdurchschnittlich häufig verwendet würde, rechtfertigte das

einen etwa gleich großen Gehalt an den beiden Isoacceptoren.

In vivo findet man nur einen tRNA^{Val}-Hauptisoacceptor bei der Chromatographie an einer RPC-5-Säule (Palatnik et al. 1977). Jedoch ließen sich nach Trennung der tRNAs auf 2-dimensionale Gelen mindestens zwei verschiedene tRNA^{Val}-Genprodukte nachweisen. Schätzt man deren Menge anhand ihrer Färbbarkeit mit Ethidiumbromid oder durch Hybridisation mit entsprechend markierten Fragmenten von Dictyostelium discoideum-DNA (Dingermann et al. 1984 in Vorbereitung), so zeigt sich, daß tRNA^{Val}_{GUU}-Genprodukte in wesentlich größeren Mengen vorliegen, als tRNA^{Val}_{GUA}-Genprodukte. Diese Ergebnisse konnten durch Dingermann, Nerke (unveröffentlichte Ergebnisse) bestätigt werden. Gesamt-tRNA von Dictyostelium wurde an einer RPC-5 Säule getrennt. Nur ein tRNA^{Val} enthaltender "peak" eluierte von der Säule. Durch Hybridisation mit den beiden tRNA^{Val} Genen konnte gezeigt werden, daß die tRNA^{Val}_{GUU} deutlich häufiger vertreten ist, daß jedoch auch die tRNA^{Val}_{GUA} in vivo exprimiert wird.

Um Aufschlüsse über die in vitro Transkriptionsrate der beiden tRNA^{Val}-Gene zu erhalten, wurden beide Gene, die in den Plasmiden pDDT 2 bzw. pDT 206 vorliegen, in X. laevis bzw. Hela-Zell-extrakten transkribiert (Dingermann, Bertling unveröffentlicht). In Hela-Zell-extrakten wurde keines der beiden tRNA^{Val}-Gene transkribiert. Die im gleichen System durchgeführte Wettbewerbsversuche gegen ein sehr aktives tRNA^{Arg}-Gen von Drosophila zeigten jedoch einen deutlichen Unterschied zwischen den beiden Dictyostelium discoideum-DNA-Fragmenten. Während das Fragment, das sowohl das tRNA^{Val}_{GUU} als auch das Pseudogen enthielt, eine sehr starken Kompetitor darstellte, zeigte ein Zusatz des Plasmids mit dem tRNA^{Val}_{GUA}-Gen keinerlei Konkurrenz. Auch ein Vergleich der Transkriptionseffizienz in X. laevis Extrakt zeigt, daß das tRNA^{Val}_{GUU}-Gen zumindest in vitro deutlich besser transkribiert wird. Als Erklärung dafür könnte einerseits unterschiedliche Promotorblöcke in den beiden tRNA^{Val}-Genen gelten, zum anderen die unterschiedlichen 5'-flankierenden Sequenzen.

5'-flankierende Sequenzen:

```

tRNAVal      AAGCTTCAATGATAGAAATIAAAACGGGTATGAGTATTTAACATGAAAAATATCGATTA
  GUA          -60              >>>>              >>>>              -1

                                ACTGA

tRNAVal      TTTTACAGGGTCTCTTIAAAATTGCGATTCTCTCAAACCATCTAAATATATTGAAACATAT
  GUA          -60              >>>>              >>>>              -1

                                ACTGA
  
```

Die A-Blöcke (geninterner Promotorbereich) im Bereich des D-Loops sind allerdings bei beiden Genen identisch, und auch die B-Blöcke, die als verantwortlich für Kompetitionseffekte bei der Transkription angesehen werden (Sharp et al. 1983, Schaack et al. 1983) unterschieden sich nur in einer einzigen Base: tRNA^{Val}_{GUA} enthält an Position 59 ein T, tRNA^{Val}_{GUA} ein C. Die Definition von Promotorblöcken bezieht sich bisher hauptsächlich auf Deletionsmutanten von tRNA-Genen. Einige Arbeitsgruppen versuchten in letzter Zeit die Ansprüche an RNA-Polymerase III-Promotorregionen durch Punktmutationen genauer abzuklären (Koski et al. 1980, Murphy, Baralle 1983, Newman et al. 1983). Nach diesen Studien kann das Purin an Position 57 durch ein T ersetzt werden und auch das A an Position 58. Außerdem scheint die Größe des T-Loops für eine effiziente Transkription nicht unbedingt 7 Nukleotide betragen zu müssen. Unter diesen Gesichtspunkten erscheinen die geninternen Promotoren des "Pseudogens" durchaus noch in der Lage zu sein, ebenfalls um Transkriptionsfaktoren zu kompetitieren.

Auf dem DNA-Fragment, das das tRNA^{Val}_{GUA}-Gen enthält - pDDt 2 - finden sich somit zwei A und zwei B-Promotorblöcke: Erstens die innerhalb des tRNA^{Val}-Gens, zweitens die innerhalb des "Pseudogens". Dies könnte die wesentlich besseren Kompetitionsergebnisse und die erhöhte Transkriptionsrate erklären, denn im Vergleich dazu enthält das tRNA^{Val}_{GUA}-Gen nur einen geninternen A- bzw. einen B-Block. Den transkriptionsfördernden Einfluß, den so eine tRNA-ähnliche Struktur bewirken kann, beobachtete auch unlängst Goddard (et al. 1983). In deren Fall handelte es sich um ein tRNA^{Glu}-Gen mit einer hohen Transkriptionsrate, dem eine tRNA-ähnliche Struktur vorgelagert ist, die allerdings nicht mit dem eigentlichen tRNA-Gen überlappt.

Auffallend war, daß in *X.laevis*-Oocyten-Kernextrakten beide tRNA^{Val}-Gene transkribiert werden (Dingermann, Bertling 1984 in Vorbereitung). In beiden Fällen (pDDt 2 und pDT 206) können einige Transkriptionsprodukte identifiziert werden, die in Kontrollexperimenten mit Plasmid-DNA ohne

Insert nicht nachweisbar sind. Im Falle des tRNA^{Val}_{GUA}-Gens findet sich allerdings nur eine sehr schwache Bande, während sich im Falle des tRNA^{Val}_{GUU}-Gens zusätzlich zu den für prämaturo und prozessierte tRNA-Gen-Transkripten erwarteten Fragmenten noch übergroße Transkriptionsprodukte finden.

Aufgrund der besseren Transkriptionseigenschaften erschien das Plasmid pDDt 2 gut geeignet, um orientierende Versuche zur Regulation von tRNA-Genen durchzuführen.

Das Vorliegen einer tRNA-ähnlichen Struktur vor dem tRNA^{Val}_{GUU} Gen legte die Vermutung nahe, daß RNA-Polymerase III-Transkriptionsprodukte einen modulierenden Einfluß auf ihre eigene Transkription haben könnten. Das ließ sich auch bestätigen. Bei großem Überschuß an tRNA (2000000 Moleküle tRNA/Plasmid, entsprechend ca. 1000 spez. tRNA Moleküle/Genom) wird die Transkription nahezu vollständig unterbunden, bzw. stark behindert (500 ng tRNA/Transkriptionsansatz). Eine geringere Menge an tRNA (50 ng tRNA/Ansatz) zeigt eine nur geringfügig unter dem Vergleichswert (kein tRNA Zusatz) liegende Transkriptionsrate. Und der Wert einer sehr kleinen Menge (5 ng tRNA/Ansatz) zeigte sogar eine erhöhte Transkriptionsaktivität.

Auch in vivo in Hefe transkribieren beide tRNA^{Val} Gene unterschiedlich. In der Arbeitsgruppe (Dingermann, Nerke pers. Mitteilung) wurden beide tRNA^{Val}-Gene in den E.coli/Hefe "shuttle-vector" yRP 17 (ein Vektor, der in beide Organismen transformiert werden kann) kloniert. Das Insert mit dem tRNA^{Val}_{GUU}-Gen beginnt bei Nukleotid -60 (inclusive "Pseudogen"), das Insert mit dem tRNA^{Val}_{GUA}-Gen bei Nukleotid -36. Keines der beiden Gene hybridisiert mit endogener tRNA von Hefe. Präpariert man also aus den transformierten Hefen tRNA und hybridisiert dagegen mit DNA-Fragmenten, die eines der tRNA^{Val}-Gene enthalten, so läßt sich nachprüfen, ob die tRNA-Gene von Dictyostelium discoideum in Hefe exprimiert werden. Tatsächlich lassen sich nur Transkriptionsprodukte von tRNA^{Val}_{GUU} nachweisen, nicht jedoch von tRNA^{Val}_{GUA}.

Da beide Gene vollständig intakte und weitestgehend identische geninterne Promotorblöcke besitzen, liegt die unterschiedliche Transkriptionsaktivität höchstwahrscheinlich an den stark differierenden flankierenden Sequenzen.

Auch Beobachtungen zur *in vivo* Expression in *Dictyostelium discoideum* (Nerke et al. 1984) weisen in die gleiche Richtung. Die Bedeutung der 5'-flankierenden Sequenzen von tRNA-Genen für die Expression von tRNAs wird in vielen Arbeiten diskutiert (DeFranco et al. 1980, DeFranco et al. 1981, Dingermann et al. 1982, Sprague et al. 1980, Schaack 1984, Larson et al. 1983). Sequenzen oberhalb der tRNA-Gene können danach sowohl einen transkriptionsfördernden (Schaack et al. 1984) wie auch hemmenden (DeFranco et al. 1981, Dingermann et al. 1982, Sprague et al. 1980, Hipskind, Clarkson 1983) Einfluß haben. Wichtig ist dabei, daß nicht nur das Vorhandensein solcher Sequenzen, sondern auch deren genauer Abstand vom Gen von entscheidender Bedeutung ist (Hipskind, Clarkson 1983). Hinweise, daß die Bedeutung der 5'-flankierenden Sequenzen mit für den jeweiligen Organismus spezifischen Faktoren zusammenhängen, stammen aus *in vitro* Transkriptionsversuchen in heterologen bzw. homologen Extrakten. Dabei wird beobachtet, daß einige Gene in Abhängigkeit von ihrer 5'-flankierenden Sequenz im heterologen System zwar noch transkribiert werden, im homologen jedoch nicht (Sharp et al. 1981a, Dingermann et al. 1982, Sprague et al. 1980). Als Mechanismus kann man sich vorstellen, daß ein oder mehrere Faktoren bestimmte Sequenzen oberhalb des tRNA-Gens erkennen und, je nachdem wie stabil sie an diese Sequenzen binden und wie weit sie vom tRNA-Gen entfernt sind, Einfluß auf die Geschwindigkeit der Bindung der A-Block-Faktoren bzw. die Stabilität der Bindung der B-Block-Faktoren nehmen können (die Bindung der A-Block-Faktoren scheint kinetisch kontrolliert und damit geschwindigkeitsbestimmend, die Bindung der B-Block-Faktoren thermodynamisch kontrolliert und damit stabilitätsbestimmend zu sein) (Schaack et al. 1984, Sharp et al. 1983). Diese modulierenden Faktoren (M-Faktoren) könnten nun in ihrer Affinität zur 5'-flankierenden Sequenz von tRNA-Genen von RNA-Polymerase III-Transkriptionsprodukten abhängig sein. Liegt ein Produkt (z.B. mature oder prä-mature tRNA) im Kernbereich in einem Mangel vor, so wird die Affinität der M-Faktoren abgeschwächt, die Bereiche der entsprechenden Promotoren werden den entsprechenden Faktoren zugänglich und die Transkription beginnt. Diese M-Faktoren wären hochspezifisch sowohl für die Sequenz der entsprechenden 5'-Bereiche als auch für die regulatorisch wirkenden Produkte und könnten so in einem heterologen System nicht oder zumindest nicht vollständig zur Wirkung kommen. Durch die jeweils innerhalb einer Genfamilie unveränderlichen geninternen Promotoren wäre

die Transkriptionsrate (Hauptisoacceptor, "minor species") prinzipiell festgelegt. Durch die Wechselwirkung der entsprechenden Genprodukte mit der jeweiligen 5'-flankierenden Sequenz könnte eine genauere Abstimmung auf den jeweiligen Ernährungs- bzw. Differenzierungsstatus der Zelle erreicht werden.

Diese Überlegungen lassen auch die Funktion des hier vorgestellten "Pseudogens" in einem anderen Licht erscheinen. Da das Plasmid pDDt 2, das das überlappende "Genpaar" enthält, ein Übergroßes Transkriptionsprodukt liefert, aber auch zu einer murenen tRNA^{Val} prozessiert wird, bleibt eine ungewöhnlich große 5'-flankierende Region übrig. Diese Region besteht im wesentlichen aus der 5'-Hälfte des tRNA-Gens bzw. dem T-Promotorteil, wie sie auch bei einigen anderen Pseudogenen zu erwarten wäre (Sprague et al. 1981a, VanAndell et al. 1981, Reilly et al. 1982, Goddard et al. 1983). Dadurch, daß diese und andere "Pseudogene" stark verstümmelt oder vielleicht auch nur leicht verändert vorliegen, findet wahrscheinlich kein korrekter Transport aus dem Kern mehr statt. Wie wichtig für diesen Transport die unversehrte Struktur ist, zeigte vor kurzem Zasloff (1983). Ein tRNA Met-Gen mit einer einzigen Punktmutation an Position 57 (G → U) wurde zwar noch korrekt transkribiert, jedoch im Kern zurückgehalten.

Es ist schon mehrmals versucht worden, allgemein gültige Übereinstimmungen in den 5'-flankierenden Sequenzen RNA-Polymerase III-Transkriptionseinheiten zu finden, um so eine regulierte, nicht konstitutive Transkription zu beschreiben. Im Fall von tRNA^{Ala} und 5 S-RNA-Genen von *Bombyx mori* wurde eine "Konsensus-Sequenz" gefunden (Morton, Sprague 1982). Ebenso für tRNA^{Lys}-Gene von *Drosophila melanogaster*, wobei festgestellt wurde, daß nicht nur die Primärsequenz sondern auch ihre Position zum codierenden Bereich von entscheidender Bedeutung ist (DeFranco et al. 1981). Schließlich identifizierten Indik und Tartoff (1982) für *Drosophila* tRNA und 5 S-RNA-Gene eine sogenannte "ACT-TA"-Box, die zwischen den Nukleotiden -29 bis -45 (oberhalb der tRNA-codierenden Sequenz) lokalisiert ist.

In dieser Arbeit wurden weitere tRNA-Gene und ihre 5'-flankierenden Sequenzen auf übereinstimmende Sequenzmerkmale hin untersucht. Unter 5. sind 20 Beispiele, darunter auch die hier beschriebenen tRNA^{Val}-Gene von *Dictyostelium discoideum* angeführt. Jedoch sind darüber hinaus auch andere tRNA-Gene untersucht worden. Bisher wurde in keinem einzigen Fall eine drastische Abweichung der nachfolgend aufgeführten Strukturprinzipien gefunden.

Für die von Indik und Tartof beschriebene "ACT-TA"-Box ergibt sich aus den hier untersuchten Sequenzen eine andere Konsensus-Sequenz. Sie lautet ACTGA. Das Nukleotid an Position -36 liegt innerhalb dieser Konsensussequenz. Bei einer hier erwähnten Ausnahme findet es sich 2 Basen vor (5') der Konsensussequenz. Bei Transkriptionsversuchen mit Deletionsmutanten von tRNA-Genen und ihren 5'-flankierenden Sequenzen wurde festgestellt, daß die Transkriptionsrate drastisch abfällt, sobald Bereiche der "ACTGA-Box" deletiert wurden (allerdings ohne von den Autoren als solche erkannt bzw. bezeichnet worden zu sein). Larson et al. (1983) fanden als kritischen Punkt, wo noch effiziente Transkription stattfand (ca. 80 %), die Position -34, die dort in der "ACTGA-Box" liegt und Schaack et al. (1984) bestimmten ihn zwischen -36 (60 %) und -32 (10 %), also ebenfalls im Bereich der dort liegenden "ACTGA-Box", wobei die Fähigkeit in Kompetitionsexperimenten stabile Komplexe auszubilden, erhalten blieb.

Oberhalb (5') dieser konservierten Sequenz (ACTGA) und z.T. überlappend damit liegt noch eine weitere gut konservierte Sequenz, die aus 4 Purin-Basen, flankiert mit je einer Pyrimidin-Base, besteht. Sehr häufig liegt sie als TAAAT vor und wird daher hier als TAAAT-Box bezeichnet. Die Basenabfolge scheint darin sogar noch höher konserviert zu sein als in der "ACTGA-Box". Diese "TAAAT-Box" liegt zwischen zwei repetitiven Sequenzen (mindestens 4 bis zu 6 Basen) oder überlappt damit. In ca. 50 % der untersuchten Fälle handelt es sich um eine direkte Wiederholung der vorausgegangenen Nukleotide, im Rest der Fälle um eine indirekte, komplementäre Wiederholung, aus der sich dann eine "stem-loop"-artige Sekundärstruktur formen läßt. Weder Larson et al. (1983) noch Schaack et al. (1984) finden bei einer Deletion dieses Bereiches eine drastische Erniedrigung der Transkriptionseffizienz im

homologen Extrakt. Nach den Ergebnissen von Schaack et al. nimmt die Effizienz sogar zu. Das könnte damit zusammenhängen, daß eventuell eine negative Rückkoppelung über das Transkriptionsprodukt durch eine Deletion dieser Sequenz verhindert wird. Eine solche Möglichkeit zur Produkthemmung könnte in der Tatsache zu suchen sein, daß der Bereich zwischen der repetitiven Sequenz zu 60-70 % homolog zu Sequenzen des codierten tRNA-Gens sind. In den meisten Fällen handelt es sich dabei um Bereiche des D-Loops und des Anticodons. Diese Erkenntnisse werfen ein neues Licht auf das "Pseudogen", das vor dem tRNA^{Val}_{GUU}-Gen von Dictyostelium discoideum liegt, unabhängig von der Tatsache, daß es mittranskribiert wird und somit auch noch auf RNA-Ebene eine Funktion haben könnte. Außer von unserem Arbeitskreis sind noch von einigen anderen (Sharp et al. 1981b, Reilly et al. 1982, Shibuya et al. 1982, Rosen et al. 1984) Pseudogene beschrieben worden, auch wenn sie nicht immer so bezeichnet wurden (Sutcliffe et al. 1984, Egan, Lundy 1978, Goddard et al. 1983, Sadhna et al. 1983, Dingermann et al. 1984). In jedem Fall handelt es sich zumindest um Teile von tRNA-Gen-ähnlichen Sequenzen (z.T. mit großen Deletionen und stark mutierten Bereichen). Auch im Fall der um die TAAAAT-Box lokalisierten Sequenzen könnte es sich um noch stärker deletierte und mutierte Teile ehemaliger tRNA-Gene handeln, die, im Gegensatz zu dem hier beschriebenen "Pseudogen", das noch transkribierbar ist, - nur noch regulatorisch wirken.

Ob dabei der "Pseudogen-Teil", das Strukturgen oder beide die autochtonen Sequenzen darstellen, läßt sich bislang nicht entscheiden. Möglich wäre, daß sich aus den bei Prokaryonten noch relativ häufigen tRNA-Clustern eines der vorderen Gene zu einem solchen Regulatorgen entwickelt hat. In einigen Fällen mag es auch durch reverse Transkription von einer tRNA und darauf folgende Reinsertion ins Genom hinter einem (dabei zum Teil deletierten ?) tRNA-Gen gekommen sein. Es ist allerdings auch möglich, daß solche kurzen transkriptions-modulierenden Sequenzen eine gewisse Beweglichkeit haben könnten, was den repetitiven Sequenzen eine gewisse Bedeutung zukommen lassen würde. Für andere -allerdings etwas längere (100-300bp) und daher leichter zu finden und nachzuweisen - verstreut in Eucaryoten vorliegende repetitive DNA-Elemente wird schon seit längerem (Jagadeeswaran et al. 1981) diskutiert, daß es sich dabei um transponierbare DNA-Elemente ("transposable elements") handelt, die durch reverse Transkription von RNA-Polymerase III-Transkripten entstanden sind. Für tandemartig arrangierte Cluster von 5 S-RNA-ähnlichen (50 % homolog) Sequenzen wird auch vorgeschlagen, sie

könnten durch Gen-Amplifikation entstanden sein und nur noch als "Abstandshalter" (spacer) zwischen Genen dienen (Wong et al. 1984). In diesem Zusammenhang möchte ich die von Eigen und Winkler-Oswatitsch 1981 veröffentlichten theoretischen Arbeiten zitieren. Aus evolutionsgeschichtlichen Vergleichen an tRNAs wurde geschlossen, daß es sich bei tRNAs um sehr archaische Moleküle handle, die schon vor ihrer Integration ins Genom eine gewisse Mutantenverteilung aufwiesen. Ferner stellen sie Überlegungen zur Theorie selbstreproduzierender molekularer Systeme an, die in dem Ergebnis gipfeln, daß es sich bei tRNA-Genen um die ersten Gene gehandelt hat. Eine besondere Bedingung stellt dabei die Komma-freie Codon-Erkennbarkeit durch Adaptoren dar, die durch uniforme Triplett-Folgen nach dem Muster PuNPu und PyNPu gegeben waren. Das hohe Alter solcher Gene könnte ihr ubiquitäres Auftreten als rudimentäre Reste vor noch funktionellen tRNA-Genen (und vor anderen ?) ebenfalls erklären.

Auffallend ist auch, daß beide Boxen den Anforderungen an ein homogenes Codonmuster (für ein "comma-free-readoff"), sofern sie noch in ihrer ursprünglichen Form vorliegen, genügen: NAC-TGA ebenso wie TAA-AAT. Weitere Computer-gestützte Vergleiche von diversen tRNA-Genen und ihren 5'-flankierenden Sequenzen sollten durchgeführt werden und in Korrelation zur Transkriptionseffizienz der entsprechenden Gene im homologen und heterologen System gesetzt werden. Die so erhaltenen Daten werfen neues Licht auf die Regulation der Transkription von tRNA und anderen Genen.

LITERATURVERZEICHNIS

- Abelson, J. 1979 Ann. Rev. Biochem. 48 1035
- Allison, D., Goh, S., Hall, B. 1983 Cell 34 655-664
- Aloni, Y., Hatlen, L.E., Attardi, G. 1971 J.Mol.Biol. 56 555
- Altwegg, M., Kubli, E. 1980 NAR 8 3259-3262
- Ames, B.N. 1984 Cell 36 523-531
- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., DeBruijn, M.H.L., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, J.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Smith, A.J.H., Schreier, P.H., Staden, R., Young, I.G. 1981 Nature 290 457
- Arai, K., Arai, N., Nakamura, S., Oshima, T., Kazivo, Y., 1978 Eur.J.Biochem. 92 521-531
- Beckman, J., Johnson, P., Abelson, J. 1977 Science 196 205
- Benton, W., Davis, R. 1977 Science 196 180
- Bergmann, J.E., Lodish, H.F. 1979 J.Biol.Chem. 254 11927-11937
- Berman, H., Landy, A. 1979 PNAS 76 4303
- Bertling, W., Dingermann, T., Sogin, M. 1984 Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem. 365 967
- Bienz, M., Kubli, E. 1981 Nature 294 188-192
- Blattner, F., Williams, B., Blechel, A., Denniston-Thompson, K., Faber, H., Farlong, L.-A., Grunwald, D., Kiefer, D., Moore, D., Sheldon, E., Smithies, O. 1977 Science 196 161
- Bogenhagen, D., Sakonju, S., Brown, D. 1980 Cell 19 27-35
- Boisnard, M., Petrisseant, G. 1981 FEBS Lett. 129 180-184
- Boliver, F., et al. 1977 Gene 2 95
- Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L., Boyer, H.W. 1977 Gene 2 95-113
- Boutorin, A.S., Clark, B.F.C., Ebel, J.P., Kruse, T.A., Petersen, H.U., Remy, P., Vassilenko, S. 1981 J.Mol.Biol. 152 595-608
- Boyer, H., Rouland-Ducoux, D. 1969 J.Mol.Biol. 41 459
- Bruce, A.G., Uhlenbeck, O.C. 1978 NAR 5 3665-3677
- Buck, H., Griffiths, E. 1982 NAR 10 2609
- Chavancy, G., Merbaix, G., Huez, G., Cleuter, Y. Biochimie 63 611
- Ciliberto, G., Castagnoli, L., Melton, D., Cortese, R. 1982 PNAS 79 1195-1199
- Clarereon, S.G., Birnstiel, M.L., Purdom, I.F. 1973 J.Mol.Biol. 79 411
- Clark, B.F. 1978 int t-RNA (Altman, S. Hreg.) MIT-Press, Cambridge GB
- Clarkson, S.G., Kuzer, V., Smith, H.O. 1978 Cell 14 713
- Clary, D.O., Wahleithner, J.A., Wolstenholme, D.R. 1983 NAR 11 2411-2425
- Claverie, P. 1971 J.Mol.Biol. 56 75-82
- Clewell, D.B. 1972 J.Bacteriol. 110 667-676
- Clewell, D., Helinski, D. 1969 PNAS 62 1159-1166
- Cocucci, S., Suesman, H. 1970 J.Cell.Biol. 45 399
- Cohen, S.N., Chang, A.C.Y., Boyer, H.W., Helling, R.B. 1973 PNAS 70 3240-3244
- Cohen, S.N., Chang, A.C.Y., Hsu, L. 1972 PNAS 69 2110-2114
- Crick, F.H.C. 1966 J.Mol.Biol. 19 548-555
- Cuatrecasas, P., Wilchek, M., Anfinsen, C.B. 1968 PNAS 61 636-643
- DeFranco, D. 1981 Dissertation Yale University Conn.

- DeFranco, D., Schmidt, O., Söll, D. 1980 PNAS 77 3365-3368
- DeFranco, D., Sharp, S., Söll, D. 1981 J.Biol.Chem. 256 12424-12429
- del Rey, F., Donahoe, T.F., Fink, G.R. 1983 J.Biol.Chem. 258 8175-8182
- Deininger, P. 1983 Anal.Biochem. 135 247-263
- Derwenzkus, K.-H., Fischer, W., Sprinzl, M. 1984 Anal.Biochem. 136 161-167
- Dingermann, T. 1980 Dissertation Universität Erlangen-Nürnberg
- Dingermann, T., Bertling, W., Pistel, F., Amon, E. 1984 Eur.J.Biochem. (im Druck)
- Dingermann, T., Bertling, W., Amon, E., Nerke, K. 1984b (eingereicht)
- Dingermann, T., Johnson-Burke, D., Sharp, S., Schaack, J., Söll, D. 1982 J.Biol.Chem. 257 14738-14744
- Dingermann, T., Mach, M., Kersten, H. 1979 J.Gen.Microbiol. 115 223
- Dingermann, T., Sharp, S., Schaack, J., Söll, D. 1983 J.Biol.Chem. 258 10395-10402
- Dingermann, T., Ogilvie, A., Pistel, F., Mülhofer, W., Kersten, H. 1981 Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 362 763-773
- Edelmann, P., Gallant, J. 1977 Cell 10 131-137
- Efstathiadis, A., Vournakis, J.N., Donis-Keller, H., Chaconas, G., Dougall, D.K., Kafatos, F.C. 1977 NAR 4 4165-4174
- Egan, J., Landy, A. 1978 J.Biol.Chem. 253 3607-3622
- Eigen, M., Winkler-Dswatitsch, R. 1981 Naturwissenschaften 68 217-228 und 282-292
- Eisinger, J., Feuer, G., Yamane, T. 1971 Nature New Biol. 231 126-128
- Elder, R., Szabo, P., Uhlenbeck, O. 1980 J.Mol.Biol. 142 1
- Firtel, R., Bonner, J. 1972 J.Mol.Biol. 66 339-361
- Fischer, W., Derwenzkus, K.-H., Sprinzl, M. 1982 Eur.J.Biochem. 125 143-149
- Folk, W.R., Hofstetter, H., Birnstiel, M.L. 1982 NAR 10 7153-7162
- Fournier, A., Chavancy, G., Garel, J.P. 1976 BBRC 72 1187-1194
- Foulkes, D., Shenk, T. 1980 Cell 22 405-413
- Fredin, A., Gruhl, H., Feldmann, H. 1975 FEBS Lett. 50 185-189
- Galli, G., Hofstetter, H., Birnstiel, M. 1981 Nature 294 626-631
- Garber, R., Gage, L. 1979 Cell 18 817
- Gause, D., Sprinzl, M. 1984 NAR 12 r1-r115
- Gavrilova, L.P., Kostiaehkina, O.E., Kofeliansky, V.E., Rutkevich, A., Spirin, A.S. 1976 J.Mol.Biol. 101 537-552
- Goddard, J., Squire, M., Bienz, M., Smith, J. 1983 NAR 11 2551-2562
- Gorini, L. 1974 in: Ribosomes (Nomara et al. Hrsg.) CSH-Laboratory New York USA
- Green, M., Grimm, H., Goewert, R., Collius, R., Cole, M., Lambowitz, A., Heckman, J. 1981 J.Biol.Chem. 256 2027
- Gronenborn, R., Messing, J. 1978 Nature 272 375
- Grosjeans, H., Söll, D., Crothers, D. 1976 J.Mol.Biol. 103 499-519
- Gruissem, W., Prescott, D.M., Greenberg, B.H., Hallick, R.B. 1982 Cell 30 81-92

- Gulewicz, K., Faulhammer, H.G., Sprinzl, M. 1981 Eur.J.Biochem. 121 155-162
- Hagenbüchle, O., Larson, D., Hall, G., Sprague, K. 1979 Cell 18 1217
- Hames, B.D., Hodson, B.A., Duddy, P. 1977 in: Developments and Differentiation in the Cellular Slime Moulds (Capuccinelli, Ashworth Hrg.) Biomedical Press Elsevier Holland
- Hatfield, D.L., Dudock, B.S., Eden, F.C. 1983 PNAS 80 4940-4944
- Hatlen, L., Attardi, G. 1971 J.Mol.Biol. 56 535
- Heckman, J.E., RajBhandary, U.L. 1979 Cell 17 583
- Hipskind, R.A., Clarkson, S.G. 1983 Cell 34 881-890
- Högenauer, G. 1970 Eur.J.Biochem. 12 527-532
- Hofstetter, H., Kressmann, A., Birnstiel, M. 1981 Cell 24 573-585
- Hohn, B. 1979 Methods Enzymol. 68 299
- Hohn, B., Murray, K. 1977 PNAS 74 2359
- Hopfield, J.J. 1974 PNAS 71 4135-4139
- Hori, H., Osawa, S., Iwabuchi, L. 1980 NAR 8 5535-5539
- Hornig, H., Lührmann, R. 1982 Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 363 876-877
- Hu, J.C., Cote, B.D., Lund, E., Dahlberg, J.E. 1983 NAR 11 4809-4821
- Hudson, L., Rossi, J., Landy, A. 1981 NAR 10 3407-3425
- Indik, Z., Tartof, K. 1982 NAR 10 4159-4168
- Jänel, G. 1984 Dissertation Universität Erlangen-Nürnberg
- Jagadenvaran, P., Forget, B.G., Weismann, S.M. 1981 Cell 26 141-142
- Jat, P., Arrand, J. 1982 NAR 10 3407-3425
- Kenerva, P., Mäenpää, P., Acta Chem.Scand. Ser.B. 35 379-385
- Kern, J., Brenner, S., Barnett, L., Cesareni, G. 1981 PNAS 77 5172
- Kersten, H. 1984 Progt.Nucl.Acid Res.Mol.Biol. 31 (im Druck)
- Kersten, H., Alban, M., Männlein, E., Preisler, R., Wurmbach, P., Nierhaus, K. 1981 Eur.J.Biochem. 114 451
- Kersten, H., Preisler, R., Männlein, E., Schellenberger, H. 1983 15th FEBS-Meeting, Brüssel, Abstr. S-08/MO-129 s.243
- Kersten, H., Schachner, E., Dese, G., Anders, A., Nishimura, S., Shindo-Okada, N. 1984 in: Biochemical and Clinical Aspects of Pteridins (Wachter, Curtius, Pflücker Hrg.) W.de Gruyter Berlin (im Druck)
- Kirilov, S.V., Makhno, V.I., Odinzov, V.B., Semenov, Y.P. 1978 Eur.J.Biochem. 89 305-309
- Klemenz, R., Stillman, D., Gelduschek, P. 1982 PNAS 79 6191-6195
- Kimmel, A.R., Firtel, R.A. 1979 Cell 16 787-796
- Kimmel, A.R., Firtel, R.A. 1980 NAR 8 5599-5610
- Kimmel, A., Firtel, R. 1982 in: The Development of Dictyostelium (Loomis Hrg.) Acad.Press N.Y.
- Kindle, K.L., Firtel, R.A. 1978 Cell 15 763-778
- Koski, R.A., Clarkson, S.G., Kurian, J., Hall, B.D., Smith, M. 1980 Cell 22 415-425
- Korn, L.J., Brown, D.D. 1978 Cell 15 1145
- Kryuko, V.M., Kaenzken, V.N., Kaliman, A.V., Bayer, A.A. 1983 FEBS 158 123
- Kubli, E., Schmidt, T. 1978 NAR 5 1465

- Kurland, C.G., Rigler, R., Ehrenberg, M., Birnberg, L. 1975 PNAS 72
4248-4251
- Lagerkvist, U. 1978 PNAS 75 1759-1762
- Lamond, A.J., Travers, A.A. 1983 Nature 305 248-250
- Landin, R.-M., Boisenard, M., Petrisant, G. 1979 NAR 7 1635-1648
- Lerson, D., Bradford-Wilcox, J., Young, L., Sprague, K. 1983 PNAS 80
3416-3420
- LaRossa, R., Söll, D. 1978 in: Transfer RNA (Altman Hrg.) MIT-Press
Cambridge, Mass.
- Lin, V.K., Farkas, W.R., Agrios, P.F. 1980 NAR 8 3481-3489
- Litt, M., Howell-Litt, R. 1980 J.Biol.Chem. 255 375-378
- Loene, W., Brammer, W. 1980 Gene 10 249
- Loftfield, R.B., Vonderjagdt, D. 1972 Biochem.J. 128 1353-1356
- Loomis, W. 1975 in: Dictyostelium discoideum: A Developmental System
Acad.Press N.Y.
- Loomis, W. 1982 in: The Development of Dictyostelium (Loomis Hrg.)
Acad.Press N.Y.
- Lürmann, R. 1980 NAR 8 5813-5824
- Lund, E., Dahlberg, J., Lindahl, L., Jasques, S., Dennis, P., Nomura, M.
1976 Cell 7 165-177
- Mach, R., Kersten, H., Kersten, W. 1982 Biochem.J. 202 153-162
- Mandel, M., Hige, A. 1977 J.Mol.Biol. 53 159-162
- Maniatis, T., Hardison, R., Lazy, E., Lauer, J., O'Connell, C., Kuon, D.
Sim, D., Efetradidis, A. 1978 Cell 15 687
- Mao, J., Schmidt, O., Söll, D. 1980 Cell 21 509-516
- Maxam, A., Gilbert, W. 1977 PNAS 74 560-564
- Maxam, A., Gilbert, W. 1980 Methods Enzymol. 65 499-560
- Messing, J. et al. 1977 PNAS 74 3642
- Messing, J., Gronenborn, B., Müller-Hill, B., Hofschneider, P.H. 1977
PNAS 74 3642-3646
- Messing, J., Vieira, J. 1982 Gene 19 269
- Miyajima, A., Shibuja, M., Kuchino, Y., Kasiro, Y. 1981 Mol.Gen. Genet.
183 13-19
- Morgan, E., Ikemura, T., Nomura, M. 1977 PNAS 74 2710-2714
- Morse, D.E., Morse, A.N.C. 1976 J.Mol.Biol. 103 209-226
- Morton, D.G., Sprague, K.U. 1982 Mol.Cell.Biol. 2 1524-1531
- Müller, F., Clarkson, S.G. 1980 Cell 19 345
- Murphy, M.H., Baralle, F.F. 1983 NAR 11 7698-7700
- Murray, M., Thompson, W. 1980 NAR 8 4321-4325
- Neke, K., Amon, E., Bertling, W., Dingermann, T. 1984 Hoppe-Seyler's
Z.Physiol.Chem. 365 1038-1039
- Newell, T.C. 1982 in: The Development of Dictyostelium (Loomis Hrg.)
Acad.Press N.Y.
- Newman, A.J., Ogden, R.C., Abelson, J. 1983 Cell 35 117-125
- Ninio, J. 1971 J.Mol.Biol. 56 63-74
- Ninio, J. 1975 Biochimie 57 587-595
- Nishimura, S. 1978 in: Transfer RNA (Altman Hrg.) MIT-Press
Cambridge Mass.

- Nishimura, S. 1983 in: Progr.Nucl.Acids Res.Mol.Biol. 12 49-85
- Novick, R.P., Cloues, R.C., Cohen, S.N., Curtis III, R., Naomi, D., Falkow, S. 1976 Bacteriol.Rev. 40 168-189
- Ogden, R., Knapp, D., Pablos, C., Johnson, J., Abelson, J. 1981 TIBS 6 154-157
- Okada, N., Shindo-Okada, N., Sato, S., Itoh, Y., Odu, K., Nishimura, S. 1978 PNAS 75 4247-4251
- Olive, J. 1978 Science 202 530-532
- Olive, J., Bluntin, T. 1980 J.Protozool. 27 293-299
- Olson, M., Montgomery, D.L., Hopper, A.K., Page, O.S., Horodyski, F. Hull, B.D. 1977 Nature 267 639
- Ott, G. 1984 Dissertation Universität Erlangen-Nürnberg
- Ott, G., Kersten, H., Nishimura, S. 1982 FEBS Lett. 146 311-314
- Oyala, D., Montoya, S., Attardi, G. 1981 Nature 290 470
- Parker, C.S., Ng, S., Roeder, R.G. 1976 in: Molekular Mechanisms in the Control of Gene Expression (Nierlich, Rutter, Fox Hrg.) Acad.Press N.Y.
- Palatnik, C., Katz, E., Brenner, M. 1977 J.Biol.Chem. 252 694-703
- Pearson, R., Weiss, J., Kelmers, A. 1971 Biochim.Biophys.Acta 228 770
- Peffley, D.N., Sogin, M.L. 1981 Biochem. 20 4015-4021
- Potapov, A.P. 1982 FEBS.Lett. 146 5-8
- Praisler, R., Männlein, E., Aschhoff, H-J., Kach, K., Kersten, W. 1984 Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 365 1155-1162
- Pribnow, D. 1975 PNAS 72 784
- Raper, K. 1935 J.Agric.Res. 50 135-147
- Reba, M., Limburg, K., Burghagen, M., Katze, J., Simsek, M., Hackman, J. RajBandhary, U., Gross, H. 1979 Eur.J.Biochem. 97 305
- Reilly, J.G., Ogden, R., Rossi, J.J. 1982 Nature 300 287-289
- Rheinberger, H.J., Schilling, S., Nierhaus, K.U. 1983 FEBS Lett. 134 421-428
- Ritossa, F., Atwood, K., Spiegelman, S. 1969 Genetics 54 663
- Roe, B.A., Stankiewicz, A.F., Rizi, H.L., Weiß, C., DiLauro, M.N., Pike, D., Chen, C.Y., Chen, E.Y. 1979 NAR 6 673-688
- Roeder, R. 1976 in: RNA-Polymerase (Losick, Chamberlin Hrg.) CSH Laboratories N.Y.
- Rogg, H., Wehrli, W., Stählin, M. 1969 Biochim.Biophys.Acta 195 13
- Ross, M., Gottlieb, E., Lerner, M., Steitz, J. 1981 Mol.Cell.Biol. 1 785-796
- Rosen, A., Sarel, S., Daniel, V. 1984 NAR 12 4893-4906
- Rossi, J., Egan, J., Berman, M.L., Landy, A. 1980 in: tRNA- Biological Aspects (Söll, Abelson, Schimmel Hrg.) CSH Laboratories N.Y.
- Roy, K.L., Cook, H., Buckland, R. 1982 NAR 10 7313
- Sadhu, J., Rajiv, L.J., Haenni, A-L., Chapeville, F. 1983 TIBS 11 402-404
- Sakonju, S., Bogenhagen, D.F., Brown, D.D. 1980 Cell 19 13-25

- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A., 1977 PNAS 74 5463-5467
- Santos, T., Zaslloff, M. 1981 Cell 23 699
- Schaarck, J., Sharp, S., Dinger, T., Johnson-Burke, D., Cooley, L., Söll, D. 1984 J.Biol.Chem. 259 1461-1467
- Schaarck, J., Sharp, S., Dinger, T., Söll, D. 1983 J.Biol.Chem. 258 2447-2453
- Schachner, E. 1984 Dissertation Universität Erlangen-Nürnberg
- Schachner, E., Kersten, H. 1984 J.Gen.Microbiol. 130 135-144
- Scherer, S., Davis, R. 1979 PNAS 76 4951-4955
- Schmidt, O., Mao, J., Ogden, R., Beckmann, J., Sakano, H., Abelson, J., Söll, D. 1980 Nature 287 750-752
- Schmidt, O., Mao, J., Silverman, S., Korunan, B., Söll, D. 1978 PNAS 75 4819-4823
- Schofield, P., Zamecnik, P. 1968 Biochim.Biophys.Acta 155 410-416
- Schweizer, E., MacKee, C., Halvorsen, H. 1969 J.Mol.Biol. 40 261
- Sekiya, T., Khorana, H.G. 1974 PNAS 71 2978
- Sharp, S., Dinger, T., Schaarck, J., DeFranco, D., Söll, D. 1983 J.Biol.Chem. 258 2440-2446
- Sharp, S., DeFranco, D., Dinger, T., Farrel, P., Söll, D. 1981 a PNAS 78 6657-6661
- Sharp, S., DeFranco, D., Silberklang, M., Hosbach, H., Schmidt, T., Kubli, E., Gergen, J., Wensink, P., Söll, D. 1981 b NAR 9 5867-5882
- Sharp, P., Knight, G., Watts, D. 1984 Biochem.J. 217 839-843
- Shibuya, K., Noguchi, S., Nishimura, S., Sekiya, T. 1982 NAR 10 4441-4448
- Shindo-Okada, N., Okada, N., Ogi, T., Goto, T., Nishimura, S. 1980 Biochemistry 19 395-400
- Silbermann, S., Gillam, I., Tener, G., Söll, D. 1979 NAR 6 435
- Silverman, S., Schmidt, O., Söll, D., Hovemann, B. 1979 J.Biol.Chem. 254 10290-10294
- Singhal, R., Kopper, R., Nishimura, S., Shindo-Okada, N. 1981 Biochem. Biophys.Rev.Comm. 99 120-126
- Singhal, R., Vakharia, V. 1983 NAR 11 4257-4272
- Sinsheimer, R. 1977 Ann.Rev.Biochem. 46 415
- Smith, A. 1980 Methods Enzymol. 65 560-580
- Söll, D. 1981 Laboratory Manual (Fawell, Sharp, DeFranco Hrag.) Yale University New Haven
- Southern, E. 1975 J.Mol.Biol. 98 503-517
- Sprague, K.U., Hagenbüchle, O., Zuniga, M. 1977 Cell 11 651
- Sprague, K.U., Larson, D., Morton, D. 1980 Cell 22 171-178
- Sprietz, M., Gause, D. 1982 NAR 10 r1-r62
- Steffensen, D., Wimber, D. 1971 Genetics 69 163

- Sugino, A., Goodman, H., Heineker, H., Shine, J., Boyer, H., Kossarelli, N.
1977 J.Biol.Chem. 252 3987
- Sussman, M. 1976 in: Methods in Cell Physiology (Prescott Hreg.) Bd.2
Acad.Press N.Y.
- Sussman, M., Sussman, R.R. 1962 J.Gen.Microbiol. 28 417-429
- Sutcliffe, J. 1978 NAR 5 2721
- Sutcliffe, J.G., Milner, R.J., Gottesfeld, J.M., Lerner, R.A. 1984 Nature
308 337-341
- Tartof, K., Perry, R. 1970 J.Mol.Biol. 51 171
- Tekamp, P., Valenzuela, P., Mayhard, T., Bell, G., Rutter, W. 1979
J.Biol.Chem. 254 955
- Tereba, A., McCarthy, B.J. 1973 Biochemistry 12 4675
- Uhlenbeck, D.C., Baller, J., Doty, P. 1970 Nature 225 508-510
- Van Ardsell, S.W., Denison, L.A., Bernstein, L.B., Weiner, A.W. 1981
Cell 26 11-17
- Villanueva, J., Bull, P., Valenzuela, P., Venegas, A. 1984 FEBS Lett.
167 165-169
- Watte, D.J., Ashworth, J.M. 1970 Biochem.J. 119 171-174
- Weil, P.A., Segall, J., Harrie, B., Ng, S., Roeder, R.G. 1979 J.Biol.Chem.
254 6163-6173
- Welker, D.L., Hirth, K.P., Williams, K.L. 1984 Cell (eingereicht)
- White, E., Tener, G., Holden, J., Suzuki, D. 1973 J.Mol.Biol. 74 635
- Williams, B., Blattner, F. 1980 in: Genetic Engineering (Setlow, Holland
Hreg.) Vol. 2 Plenum N.Y.
- Wong, W.M., Abrahamson, J.L.A., Naeer, R.M. 1984 PNAS 81 1768-1770
- Woo, S., Dugaiczky, A., Tsai, M.-J., Lai, E., Catterall, J., O'Malley, B.
1978 PNAS 75 3688
- Wosnik, M., White, B. 1979 Biochim.Biophys.Acta 561 194
- Yanofski, C. 1981 Nature 289 751-758
- Zada-Hames, I.M. 1977 J.Gen.Microbiol. 99 201-208
- Zada-Hames, I.M., Ashworth, J.M. 1978 Dev.Biol. 63 307-320
- Zaslhoff, M. 1983 PNAS 80 6436-6440
- Zubrod, E. 1982 Diplomarbeit Universität Erlangen-Nürnberg

Bei Frau Prof. Dr. H. Kersten möchte ich mich für die Überlassung des Themas und die Anregungen während der Durchführung bedanken, bei Herrn Prof. Dr. W. Kersten für den Arbeitsplatz an seinem Institut.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. I. Dingermann für seine unentbehrliche Hilfe bei der Durchführung des Molekulargenetischen Teils der Arbeit.

Bei allen anderen Mitarbeitern des Instituts möchte ich mich für ihre Hilfsbereitschaft bedanken.

Lebenslauf

Name: Bertling Wolf

Geburtsdatum: 1.9.1952

Geburtsort : Fürth/Bay., Bundesrepublik Deutschland

Ausbildung :

8.6.1973 Abitur am Marie-Therese-Gymnasium in Erlangen

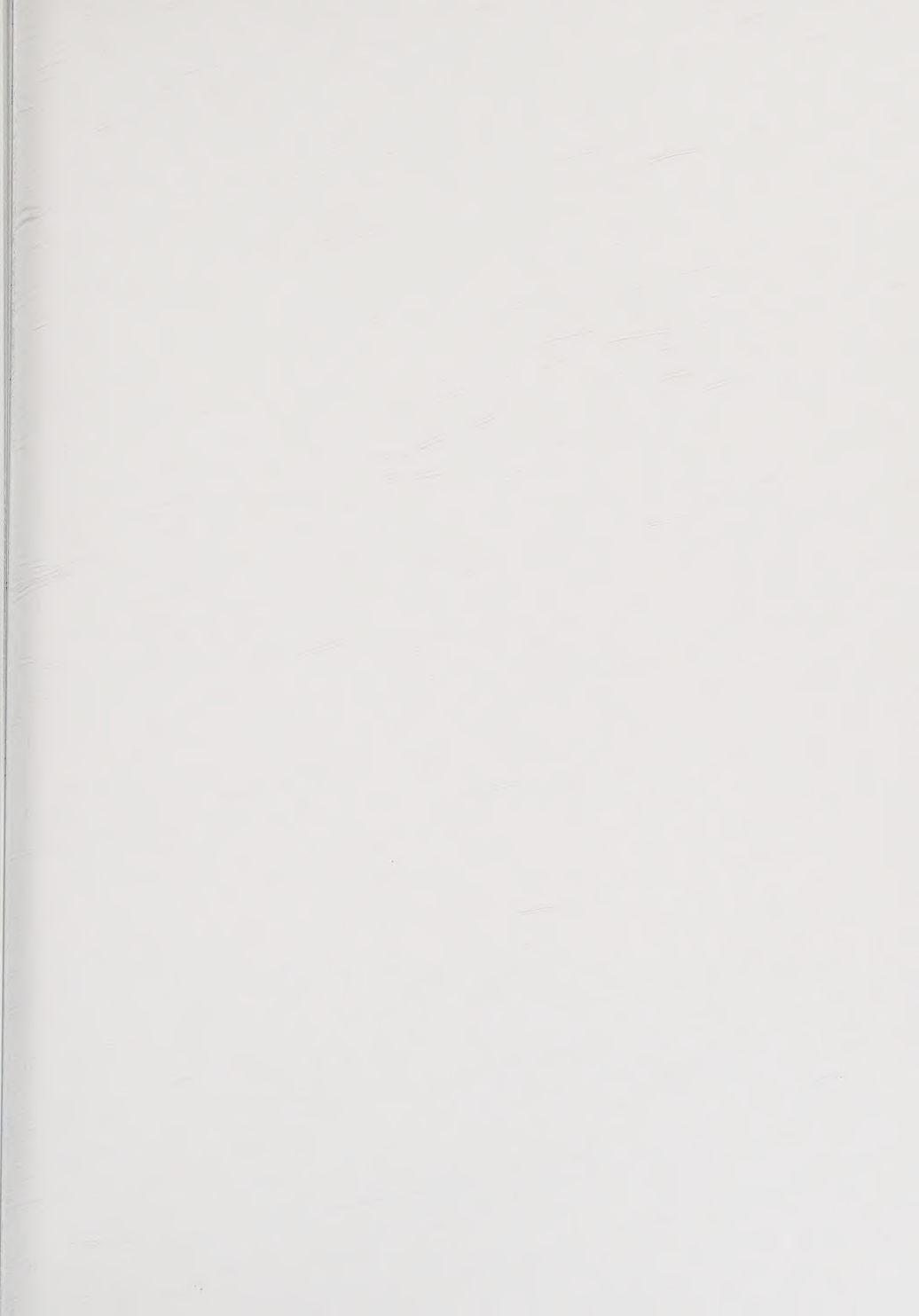
1973- 1978 Studium an der Universität Erlangen- Nürnberg:
Biologie und Chemie

Herbst 1978 Staatsexamen

1978- 1981 Studium an der Universität Erlangen- Nürnberg:
Pharmazie

Frühjahr 1981 Staatsexamen

1980- 1984 Promotionsstudium am Institut für Physiologische
Chemie an der Universität Erlangen- Nürnberg bei
Frau Prof. Dr. H. Kersten



COPY-SHOP
Pfarrstraße 9
8520 Erlangen Tel. 28525